

**Charakterisierung der Struktur und Funktion
von rekombinant exprimiertem
und aus Knochen aufgereinigtem
humanem Bone Sialoprotein**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Martina Wuttke
aus Gummersbach

Köln
2000

Berichterstatter:

Prof. Dr. Mats Paulsson

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

13.2.2001

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts, die mir die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit ermöglicht haben und mir fachlich zur Seite standen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Mats Paulsson für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung sowie seine stete Unterstützung, bei Dr. Patrik Maurer für die ausgezeichnete Betreuung, bei Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch und Dr. Stefan Müller für ihre engagierte Unterstützung bei der Glykananalyse, bei der Firma Immundiagnostik für die gute Zusammenarbeit, bei Dipl. Chem. Patric Nitsche für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten, bei Karola Busse für die Durchsicht des Manuskripts, bei Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Aufbau und Entwicklung des Knochens	3
2.2 Bone Sialoprotein	5
2.2.1 Zusammensetzung und Struktur des Proteins	5
2.2.2 Das BSP-Gen	6
2.2.3 Expression und Vorkommen von BSP	7
2.2.4 Potenzielle Funktionen im Knochen	9
2.2.5 Klinische Studien zur Analyse von BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen	11
2.3 Glykosylierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen	13
2.3.1 Biosynthese der N-Glykane	14
2.3.2 Biosynthese der O-Glykane	17
2.4 Ziel der Arbeit	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Molekularbiologie	20
3.1.1 Allgemeine Methoden	20
3.1.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
3.1.1.2 Ligation	20
3.1.1.3 Transformation	20
3.1.1.4 Präparation von Plasmid DNA	21
3.1.1.5 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA	21
3.1.1.6 Agarosegelelektrophorese	21
3.1.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
3.1.1.8 DNA-Sequenzierung	22
3.1.1.9 Glycerinkulturen	23
3.1.2 Herstellung und Einführung von Fusionspeptidsequenzen in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu	23
3.1.3 PCR-Amplifikation und Klonierung der BSP cDNA	25

3.2 Zellkultur	26
3.2.1 Herkunft und Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zell-Linien	26
3.2.2 Transfektion, Selektion und Ernte von serumfreien Zellkulturüberständen	27
3.2.3 Zellkulturmodell für die mineralisierte Knochenmatrix	28
3.2.4 Calciumbestimmung	29
3.2.5 Phosphatbestimmung	29
3.2.6 Darstellung von in Zellkultur gebildetem Hydroxylapatit	30
3.2.7 Zelladhäsionsassay	30
3.3 Proteinbiochemie	31
3.3.1 Allgemeine Methoden	31
3.3.1.1 Fällung von Proteinen	31
3.3.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.3.1.3 Coomassiefärbung	32
3.3.1.4 Silberfärbung	32
3.3.1.5 Färbung mit Stains All	33
3.3.1.6 Quantifizierung von Proteinen	33
3.3.1.6.1 BCA	33
3.3.1.6.2 UV-Spektroskopie	33
3.3.1.7 Aufkonzentrierung von Proteinen	34
3.3.1.8 N-terminale Ansequenzierung	34
3.3.2 Chromatografische Verfahren	34
3.3.2.1 Anionenaustauscherchromatografie zur Aufreinigung von BSP aus humanen Knochen	35
3.3.2.2 Affinitätschromatografie	36
3.3.2.2.1 Nickel-NTA-Matrix	36
3.3.2.2.2 Gluthathion-Matrix	36
3.3.2.2.3 Hydroxylapatit-Matrix	37
3.3.3 Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität in BSP-Fusionsproteinen	37
3.3.4 Abspaltung und Entfernung der Fusionspeptide	37
3.3.5 Extraktion von BSP aus humanem Knochenmehl	38
3.3.6 Extraktion von BSP aus Hydroxylapatitkristallen	39
3.3.7 Behandlung von BSP mit Protein Phosphatase 1	39
3.3.8 Calcium abhängiger α -Chymotrypsin Verdau von BSP	40
3.3.9 Circular dichroismus-Spektroskopie	40

3.3.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Rotationsbedampfung, Negativkontrastierung)	41
3.3.11 Fibrillogenese von Collagen I	41
3.3.12 Cyanogenbromidspaltung von Collagenen	42
3.4 Immunchemie	42
3.4.1 Affinitätsreinigung von BSP	42
3.4.2 Immunoblot	43
3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	44
3.4.4 FACS	45
3.4.5 BSP-ELISA	46
3.4.6 Collagen I-BSP-Bindungstest	46
3.5 Glykoanalytik	47
3.5.1 Abspaltung und Isolierung von N-Glykanen	47
3.5.2 Abspaltung und Isolierung von O-Glykanen	48
3.5.3 Markierung von Glykanen mit einem Fluoreszenzfarbstoff	48
3.5.4 Verdaus mit Glykosidasen	48
3.5.5 HPLC-Analyse von fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden	49
3.5.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Rekombinante Herstellung von BSP	51
4.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren	51
4.1.2 Amplifikation und Klonierung der cDNA für humanes BSP	51
4.1.3 Transfektion	52
4.1.4 Aufreinigung	54
4.2 Aufreinigung von BSP aus humanen Knochen	58
4.3 Biochemische Charakterisierung	60
4.3.1 N-terminale Proteinansequenzierung	60
4.3.2 Konzentrationsbestimmung	60
4.3.3 Molekulargewichtsbestimmung	62
4.3.4 Sekundärstrukturanalyse und Calciumbindung	63
4.3.4.1 CD-Spektroskopie zur Analyse der Sekundärstruktur	64
4.3.4.2 Einfluss von Calcium auf die Proteinkonformation	65
4.3.5 Posttranslationale Modifizierungen	67
4.3.5.1 N-Glykane	67
4.3.5.2 O-Glykane	73
4.3.5.3 Chondroitinsulfate und Phosphate	78

4.3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	79
4.4 Funktionelle Charakterisierung	80
4.4.1 Potenzielle Funktionen im Knochen	80
4.4.1.1 Bindung an Collagene	80
4.4.1.2 In vitro Modell für die mineralisierte Knochenmatrix	82
4.4.1.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von BSP, Fibronectin und Collagen I	84
4.4.1.2.2 Extraktion von BSP aus Hydroxylapatitkristallen	86
4.4.1.3 Hydroxylapatitaffinität	89
4.4.2 BSP und Brustkrebs	90
4.4.2.1 BSP-Expression humaner Brustkrebszell-Linien	91
4.4.2.2 Adhäsion von Brustkrebszellen an rekombinantes BSP	94
5 Diskussion	97
5.1 Strukturmerkmale von rekombinantem und aus Knochen isoliertem BSP	97
5.2 Glykosylierung von BSP	100
5.3 Charakterisierung der Interaktion von BSP mit den extrazellulären Matrixproteinen Collagen I und Fibronectin	104
5.4 BSP als Nukleator für Hydroxylapatitkristalle	106
5.5 Welche Rolle spielt BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen?	109

Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Anhang

Sequenzen der in den pCEP-Pu Expressionsvektor einklonierten Elemente

HPLC-Profil der Standard N-Glykane

Kurzzusammenfassung

Abstract

Lebenslauf

Erklärung zur Dissertation

1 Zusammenfassung

Die Funktion von Bone Sialoprotein (BSP), welches 10% der nicht-collagenartigen Proteine des Knochens ausmacht, ist nicht genau geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass BSP am Umbau und an der Mineralisation des Knochens sowie an der bevorzugten Metastasierung von Brusttumorzellen im Knochen beteiligt sein könnte. Der BSP-Serumspiegel ist bei Patienten mit verschiedenen Knochenstoffwechselerkrankungen sowie bei Brustkrebspatientinnen, die im Verlauf ihrer Erkrankung Knochenmetastasen entwickelten, erhöht.

In dieser Arbeit wurde BSP rekombinant in verschiedenen Zell-Linien hergestellt, unter nativen Bedingungen aus humanen Knochen aufgereinigt und strukturell und funktionell charakterisiert: Die Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie ergab einen geringen Anteil an α -Helix und β -Faltblatt Elementen und einen größeren Anteil an Zufallsknäuelstruktur, wobei das Knochen-BSP weniger Sekundärstrukturelemente aufwies als das rekombinante BSP. Calcium hatte keinen Einfluss auf CD-messbare Veränderungen der Sekundärstruktur, förderte aber geringfügig den proteolytischen Abbau von BSP mit der Ca^{2+} -unabhängigen Protease α -Chymotrypsin, was auf eine Calcium induzierte Konformationsänderung hindeutet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem BSP zeigten eine globuläre Struktur mit 10 +/- 1 nm Durchmesser, die mit einer elongierten Struktur von 25 +/- 6 nm Länge verbunden war. Die Analyse der Glykosylierung mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie führte zur Identifizierung von core fukosylierten bi-, tri- und tetraantennären N-Glykanen mit jeweils ein bis vier N-Acetylneuraminsäuren und acht verschiedenen von *core1* oder *core2* abgeleiteten O-Glykan-Strukturen. Während die N-Glykane auf Knochen-BSP und auf rekombinantem BSP sich nur im prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen unterschieden, waren bei den O-Glykanen des Knochen-BSPs im Gegensatz zum rekombinanten BSP keine *core2*-Strukturen vorhanden. Die auf Knochen-BSP vorkommenden kurzen, stark sialinisierten *core1*-Strukturen sind in Tumorzellen häufig auftretende O-Glykane. Chondroitinsulfatketten und Dermatansulfatketten wurden nicht gefunden.

Die Assoziation von BSP mit Collagen I wurde untersucht, weil das Collagenetzwerk vermutlich für die Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen bei der Mineralisierung der Knochenmatrix benötigt wird und weil BSP in vitro als de novo Nukleator für Hydroxylapatitkristalle fungiert. Mit Hilfe eines Festphasenassays konnte keine Bindung von rekombinantem BSP an Collagen I festgestellt werden, was durch Immunfluoreszenzanalysen in vitro bestätigt wurde. In einem Zellkulturmodell für die mineralisierte Knochen-

matrix konnte BSP im Cytosol von Osteosarkomzell-Linien mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Das ins Kulturmedium sekretierte BSP wurde in Gegenwart von β -Glycerophosphat in die gebildeten Hydroxylapatitkristalle eingebaut, was die Funktion von BSP als Nukleator bei der Mineralisierung der Knochenmatrix unterstützt. Mit einer Hydroxylapatitsäule konnte gezeigt werden, dass das aus humanen Knochen isolierte BSP die stärkste Affinität für Hydroxylapatit besaß, gefolgt von rekombinantem BSP aus der Mammakarzinomzell-Linie MCF-7 und der Nierenzell-Linie EBNA-293. Da alle untersuchten BSPs humanen Ursprungs waren, sind die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen als Ursache für die unterschiedlich starke Bindung an Hydroxylapatit anzunehmen.

Mittels Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen konnte die endogene Expression von BSP in vier verschiedenen Mammakarzinomzell-Linien nachgewiesen werden, während nur zwei davon BSP auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die vier untersuchten Mammakarzinomzell-Linien adhärten unterschiedlich stark an rekombinantes BSP, wobei sich keine Korrelation zwischen Adhäsion und Zelloberflächenexpression von BSP ergab. Die Abnahme der Zelladhäsion bei Verwendung von denaturiertem BSP und die Zunahme der Adhäsion auf ca. 90% des Normalwertes bei Verwendung von wieder renaturiertem Protein deutet darauf hin, dass die Ausbildung einer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Proteins für die Zellbindung wichtig ist.

In dieser Arbeit wurde BSP in voller Länge rekombinant in humanen Zell-Linien exprimiert, was die Charakterisierung der Struktur und Funktion des nativen Proteins mit seinen zelltypspezifischen posttranslationalen Modifizierungen ermöglicht und eine entscheidende Verbesserung gegenüber Daten, die mit dem bisher verwendeten denaturierten- oder in Bakterien exprimierten BSP ermittelt wurden, darstellt.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Entwicklung des Knochens

Der Knochen ist ein spezialisiertes Bindegewebe, welches zusammen mit dem Knorpel das Skelettsystem bildet, dessen Hauptfunktionen die Stützung des Körpers, der Schutz der inneren Organe, die im Zusammenspiel mit Muskeln und Gelenken erfolgende Bewegung sowie die Regulation der Calcium-Homöostase des Körpers sind. Das adulte humane Skelett besteht aus ca. 200 Knochen, deren Bildung auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht. Bei der desmalen bzw. perichondralen Ossifikation wird die mineralisierte Knochenmatrix auf mesenchymalem faserigem Bindegewebe gebildet (z. B. Schädelknochen). Die Röhrenknochen (z. B. Oberarm, Oberschenkel, Schienbein) werden hauptsächlich durch enchondrale Ossifikation gebildet. Hierbei entsteht zunächst aus dem Mesenchym Knorpel, der sekundär durch Knochenmatrix ersetzt wird.

Von außen wird der Knochen von der Knochenhaut (Periost) umgeben, die für die Bildung der Knochenrinde und für die Gefäßversorgung wichtig ist. Daran schließt sich die Kortikalis an, die aus spindelförmigen Einheiten besteht, in deren Inneren sich der Haver'sche Kanal mit den Blutgefäßen befindet. Der kortikale Knochen macht 80% der Skelettmasse aus. Er geht in das Netzwerk von Knochenbälkchen (Spongiosa, 20% der Skelettmasse) über, dessen Zwischenräume das Knochenmark füllt. Das Längenwachstum des Röhrenknochens geschieht durch enchondrale Ossifikationsprozesse, ausgehend von den knorpelartigen Wachstumsfugen, die sich zwischen Epiphyse und Metaphyse befinden. Der Mittelteil des Knochens, durch den die beidseitigen Wachstumszonen voneinander getrennt sind, wird als Diaphyse bezeichnet.

Die vier Hauptzelltypen des Knochens gehen aus dem Mesenchym hervor. Die hauptsächlich für den Aufbau des Knochens verantwortlichen Osteoblasten sind typische sekretorische polarisierte Zellen mit einem ausgeprägten rauen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat. Sie befinden sich als Einzelzellschicht auf der Oberfläche der Knochenmatrix und produzieren das Osteoid, eine Perizellulärmatrix, die später durch die Einlagerung von Hydroxylapatit verkalkt. Während der Knochenbildung werden die Osteoblasten schrittweise in die mineralisierte Knochenmatrix eingelagert und dann als Osteozyten bezeichnet, die über lange Cytoplasmafortsätze miteinander verbunden sind, welche der Ernährung und Kommunikation dienen. In adultem Knochen wird die Knochenoberfläche von metabolisch inaktiven Zellen (bone lining cells) bedeckt, wobei es sich um ruhende Osteoblasten handelt. Die für den Knochenabbau zuständigen

Osteoklasten stammen von Monozyten ab und sind mehrkernige Riesenzellen mit einem Mikrovillisaum. Die Abbauleistung von einem Osteoklasten entspricht der Aufbauleistung von 100 Osteoblasten.

Nach Abschluss des Längenwachstums wird der adulte Knochen ständig umgebaut, um alte oder brüchige Knochensubstanz zu erneuern. Bei diesem Umbau wird Knochenmatrix zunächst abgebaut, bevor neuer Knochen gebildet wird. Nach Aktivierung der Osteoblasten durch mechanischen Stress, Parathormon oder 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ resorbieren sie das Osteoid und sekretieren Proteine, an die Osteoklasten mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden können. Dabei ist der Mikrovillisaum der Osteoklasten, der mit seiner Protonenpumpe das Absinken des pH-Werts verursacht und dadurch die Hydroxylapatitkristalle auflöst, in Richtung der Knochenmatrix orientiert. Weiterhin sekretieren die Osteoklasten lysosomale Enzyme, Collagenasen und saure Proteasen, um die organische Knochenmatrix abzubauen. Die Abbauprodukte der resorbierten Matrix werden von den Osteoklasten phagocytiiert. Vor dem Verlassen der Resorptionslakune sekretieren die Osteoklasten Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, Interleukine und Cytokine, die Osteoblasten aktivieren, neue Knochenmatrix zu synthetisieren, um damit die Resorptionslakune wieder aufzufüllen.

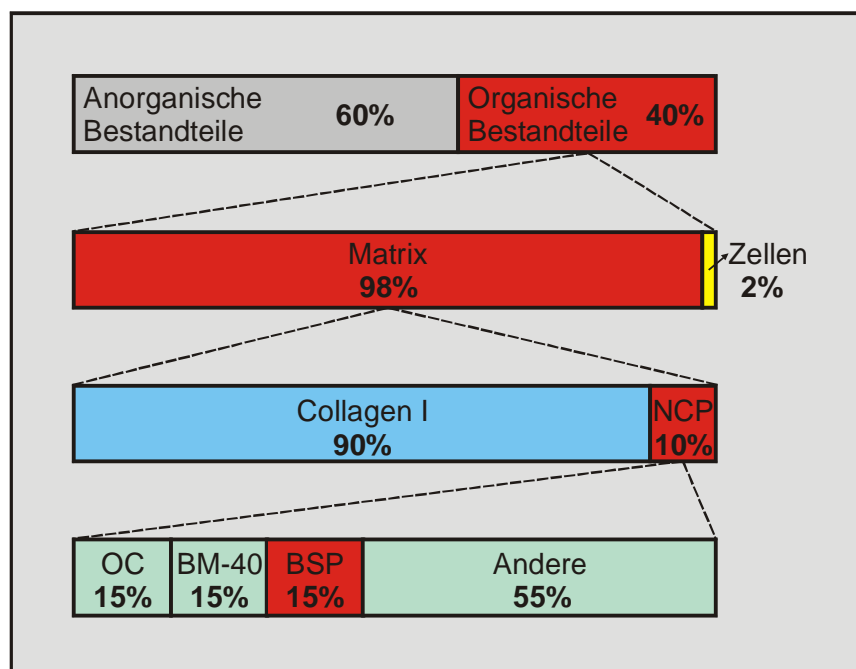


Abb. 1: Zusammensetzung des Knochens.

Erläuterungen im Text. Nicht-collagenartige Proteine (NCP), Osteocalcin (OC).

Der Knochen ist aus ca. 60% anorganischen Bestandteilen und 40% organischer Masse zusammengesetzt (s. Abb. 1). Bei den anorganischen Substanzen handelt es sich hauptsächlich um Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, daneben sind noch Fluorapatit, Carbonapatit, Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat vorhanden. Zu den organischen Bestandteilen gehören 2% Zellen und 98% Knochenmatrix. Collagen I macht 90% der Matrixbestandteile aus, die restlichen 10% setzen sich aus nicht-collagenartigen Proteinen zusammen, wobei Osteocalcin, BM-40 (Osteonectin) und Bone Sialoprotein mit einem jeweiligen Anteil von 15% dominieren (Woitge et al., 1993, Horton, 1993, Schenk et al., 1993).

2.2 Bone Sialoprotein

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein nicht-collagenartiges Protein, das von Herring 1972 zum ersten Mal aus bovinen Knochen isoliert wurde (Herring, 1972). Sein Anteil an den gesamten nicht-collagenartigen Proteinen des Knochens ist mit 15% sehr hoch (Fisher et al., 1983).

2.2.1 Zusammensetzung und Struktur des Proteins

Humanes BSP besteht aus einer Polypeptidkette von 317 Aminosäuren, welche sich nach Abspaltung des Signalpeptids auf 301 Aminosäuren reduziert. Es sind keine Cysteinreste vorhanden. (Fisher et al., 1990). In der Nähe des C-Terminus befindet sich ein RGD Zellbindungsmotiv, über das BSP an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden kann (Oldberg et al., 1988 a). Es gibt drei Tyrosin-reiche Regionen, zwei davon flankieren die RGD-Sequenz und eine befindet sich in der Nähe des N-Terminus (s. Abb. 2). Etwa die Hälfte aller Tyrosinreste im BSP sind sulfatiert (Ecarot-Charrier et al., 1989, Midura et al., 1990). N-terminal gibt es zwei Glutaminsäure-reiche Regionen mit jeweils acht hintereinanderliegenden Glutaminsäuren (s. Abb. 2), daneben gibt es mehrere Bereiche mit kürzeren Glutamatwiederholungen (Oldberg et al., 1988 b). Bedingt durch den hohen Anteil an den sauren Aminosäuren Glutamat (19%) und Aspartat (15,4%) liegt der isoelektrische Punkt des Moleküls bei 3,9. Die von der humanen cDNA abgeleitete Molekularmasse beträgt 33,6 kDa (Fisher et al., 1990). Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE lässt sich das Protein jedoch als 80 kDa Bande identifizieren (Franzén et al., 1985, Fisher et al., 1987) und die mittels Gleichgewichtszentrifugation bestimmte Molekularmasse liegt bei 57,3 kDa für BSP aus bovinen Knochen (Franzén et al., 1985). Der Grund für diesen Größenunterschied ist der hohe Anteil an posttranslationalen Modifizierungen, wobei Kohlenhydrate ca. 50% des Gesamtgewichts des

Proteins ausmachen. Die Zusammensetzung von BSP in Gewichtsprozent wurde mit 50% Protein, 12% Sialinsäuren, 7% Glukosaminen und 6% Galaktosaminen angegeben (Fisher et al., 1983), wobei der hohe Anteil an Sialinsäuren der Grund für die Namensgebung war. Es sind sowohl N-glykosidisch als auch O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate vorhanden (Franzén et al., 1985). Bei BSP, das aus Schädelknochen des Kaninchens isoliert wurde, handelt es sich im Gegensatz zu BSP aus anderen Spezies um ein Keratansulfat-Proteoglykan (Kinne et al., 1987). Die dreidimensionale Struktur von BSP ist noch unbekannt. Von der C-terminalen Domäne, die die RGD-Sequenz enthält und wahrscheinlich frei von Glykanen ist, wurden 59 Aminosäuren rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels NMR als Zufallsknäuelstruktur beschrieben (Stubbs et al., 1997).

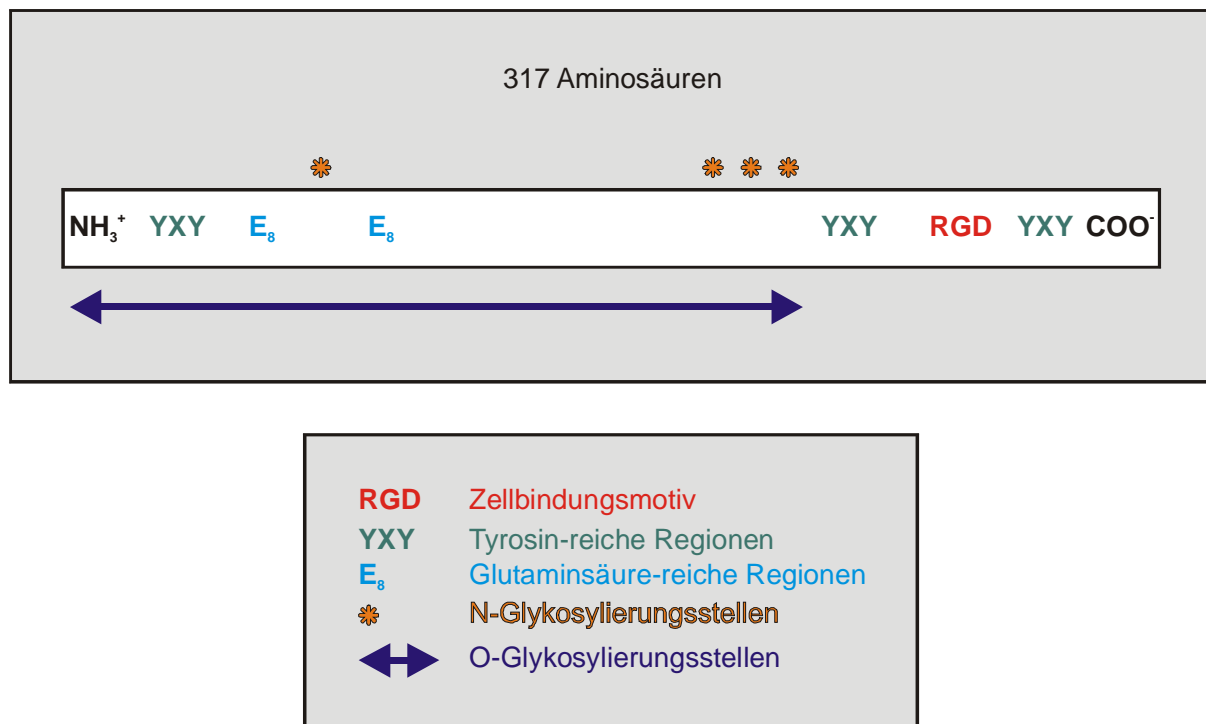


Abb. 2: Bone Sialoprotein.

Strukturelemente. Erklärung im Text.

2.2.2 Das BSP-Gen

Das Gen für humanes BSP wurde auf Chromosom 4 in der Region 4q28-q31 kartiert (Fisher et al., 1990, Kerr et al., 1993). Es ist ein single copy Gen von 15 kb Länge, bestehend aus einer drei kb langen Promotorregion, sieben Exons und sechs Introns. Exon 1 wird nicht translatiert, Exons 2-6 sind mit 51 bp bis 159 bp relativ kurz und Exon 7 (2,5 kb) kodiert über

die Hälfte des Proteins einschließlich der RGD-Sequenz bis zum C-Terminus (Kim et al., 1994). Bisher sind für keine Spezies Spleißvarianten gefunden worden. Die Promotorregion des humanen BSP-Gens enthält eine invertierte TATA-Box und eine invertierte CCAAT-Box, die beide für die Transkription benötigt werden und in normaler 5'-3'-Richtung arbeiten (Sodek et al., 1996). Die TATA-Box wird von einem Vitamin D₃-Reaktionselement überlappt, das die Vitamin D₃-verursachte Hemmung der BSP-Expression vermittelt (Kim et al., 1996; Li et al., 1998). Die invertierte CCAAT-Box wird von dem NF-Y Transkriptionsfaktor gebunden und über einen Src Kinase-Signaltransduktionsweg reguliert (Kim et al., 1999). Weiter in 5'-Richtung ist ein Pit-1-Suppressionselement vorhanden, über das die Parathormon-stimulierte BSP-Transkription reguliert wird (Ogata et al., 2000). Danach folgt eine AP-1-Bindungsstelle und eine Homöobox, an die das Dlx5 Homöoprotein bindet und die Osteoblasten spezifische BSP-Expression vermittelt (Benson et al., 2000). Anschließend folgt eine dem Retinsäurerezeptorelement ähnliche invertierte Sequenzwiederholung, eine mit dem TGF- β -Aktivierungselement (Ogata et al., 1997) überlappende AP-2-Bindungsstelle sowie eine AP-1-Bindungsstelle, die von einem Glucocorticoid-Reaktionselement überlappt wird, das an der durch Dexamethason induzierbaren BSP-Expression beteiligt ist (Yamaouchi et al., 1996). Bisher wurden die cDNA-Sequenzen für humanes BSP (Fisher et al., 1990), Ratten-BSP (Oldberg et al., 1988), Maus-BSP (Young et al., 1994), Bovines BSP (Chenu et al., 1994), Hamster-BSP (Sasaguri et al., 1996) und Hühner-BSP (Yang et al., 1995) ermittelt.

2.2.3 Expression und Vorkommen von BSP

In Knochen und Knorpelgewebe wird BSP von reifen Osteoblasten, Osteocyten, Osteoklasten, hypertrophen Chondrocyten (Bianco et al., 1991), Odontoblasten, Zementoblasten (Somerman et al., 1991, Chen et al., 1992, Sommer et al., 1996, Bosshardt et al., 1998) und von reifen Ameloblasten, die die Matrix des Zahnschmelzes synthetisieren (Chen et al., 1998), exprimiert. Außerhalb des Skeletts wurde BSP in Trophoblasten der humanen Plazenta (Bianco et al., 1991) und in Blutplättchen gefunden, wobei letzteres vermutlich nicht von den Megakaryozyten selbst synthetisiert wird, sondern durch Endocytose vom Plasma in die Zellen gelangt (Chenu et al., 1992).

BSP ist in der mineralisierten Knochenmatrix nicht gleichmäßig verteilt. Die höchsten Konzentrationen finden sich in Bereichen, in denen eine Neusynthese von Knochen stattfindet und zwar im Osteoid der Wachstumsfuge, welches von den einwandernden Osteoblasten angrenzend zu dem calcifizierten Knorpel synthetisiert wird und in den Zellen

an der Grenze zwischen Epiphyse und Metaphyse (Chen et al., 1991, Hultenby et al., 1994). Analog hierzu finden sich hohe BSP-Konzentrationen in Bereichen, in denen Knochenumbau stattfindet und zwar entlang der sogenannten Zementlinien, wo alter Knochen von Osteoklasten resorbiert wurde und die neue Knochenmatrix synthetisiert wird (Ingram et al., 1993; Chen et al., 1994). In Teilung befindliche Osteoblasten synthetisieren kein BSP. Nur voll ausgereifte, sekretierende, sich nicht mehr teilende Osteoblasten synthetisieren BSP, wenn sie an der Neusynthese oder am Umbau des Knochens beteiligt sind (Bianco et al., 1993 a). Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte immunreaktives BSP im Golgi-Apparat von Osteoblasten nachgewiesen werden, wobei es besonders im Trans-Golgi-Apparat und in den postsekretorischen Vesikeln konzentriert war. Das raue endoplasmatische Retikulum (ER) war negativ für BSP (Bianco et al., 1993 b). Die Anwesenheit von BSP im Golgi-Apparat und die Tatsache, dass das Protein im rauen ER nicht nachgewiesen werden konnte, könnte einen mit extensiver Glykosylierung verbundenen langsamen Transport von BSP durch den Golgi-Apparat bedeuten. Immunogoldfärbungen auf ultrastrukturellem Niveau zeigten, dass BSP in der Knochenmatrix von fötalen Schädelknochen des Schweins (desmale Ossifikation) nicht zufällig verteilt, sondern mit Orten der Mineralisation assoziiert war, welche sich durch nadelförmige Hydroxylapatitkristalle auszeichneten (Chen et al., 1994).

Außerdem wird BSP von verschiedenen Tumoren exprimiert, die bevorzugt in Knochen metastasieren, wie Brust-, Prostata-, Lungen- und Schilddrüsentumore, Neuroblastom und Multiples Myelom (Bellahcène et al., 1994, Waltregny et al., 1998, Bellahcène et al., 1997 a, 1998 a, 1998 b, 1996 b). Darüber hinaus exprimieren Knochenmetastasen, die in Brust- und Prostatakrebspatienten untersucht wurden, wesentlich mehr BSP als viscerale Metastasen (Waltregny et al., 2000). Interessanterweise werden sowohl in Plazenten als auch in Brusttumoren in späteren Stadien aus Hydroxylapatitkristallen bestehende mineralisierte Bereiche gebildet.

In humanen malignen Brustkrebszellen und in Knochenmetastasen wurde BSP sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Cytoplasma gefunden (Bellahcène et al., 1996 c). Die Expression innerhalb eines Tumors ist heterogen. Einige metastatische Tumorzellen, die viel BSP exprimieren, wurden in engem Kontakt zu Knochenbälkchen beobachtet. (Waltregny et al., 2000). Im Brustgewebe sind die BSP-exprimierenden Tumorzellen oft mit Mikrocalcifizierungen assoziiert (Bellahcène et al., 1996 d, 1997 b), aber es gibt auch BSP-überexprimierende maligne Brusttumore ohne mikroskopisch sichtbare Calcifizierungen (Bellahcène et al., 1994).

2.2.4 Potenzielle Funktionen im Knochen

Die Funktion von BSP in Knochen und Knorpelgewebe ist nur teilweise bekannt. Die RGD-Sequenz, die an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet (Oldberg et al., 1988 a), ermöglicht dem Protein die Adhäsion an Zelloberflächen verschiedener Säugerzellen. So wurde z. B. die Bindung von BSP an Fibroblasten (Somerman et al., 1998), Chondrocyten (Sommarin et al., 1989), Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) (Bellahcène et al., 2000, Byzova et al., 2000), Osteoprogenitorzellen (Roche et al., 1999), Osteoblasten (Grzesik et al., 1994, Ivanov et al., 1995) und Osteoklasten (Helfrich et al., 1992, Flores et al., 1992, 1996) nachgewiesen. Dabei konnte die Adhäsion von BSP an die verschiedenen Zelltypen selektiv durch die Zugabe von $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpern oder RGD-Sequenz enthaltenden Peptiden blockiert werden.

Bei den HUVEC Zellen wurde neben der Adhäsion eine BSP-konzentrationsabhängige Migration der Zellen beobachtet. Beide Aktivitäten konnten durch die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ mit Mn^{2+} oder PMA (Phorbol Myristat Acetat) nochmals verstärkt werden (Byzova et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass BSP die Angiogenese stimuliert (Bellahcène et al., 2000). Die Zugabe von BSP zu Osteoprogenitor-ähnlichen Maus MC3T3-Zellen führte zur Stimulierung der Proliferation, Differenzierung und Calcifizierung der Zellen (Zhou et al., 1995). Ebenso förderte BSP die Differenzierung von Knochenmarkszellen der Ratte zum Osteoblasten-Phänotyp (Mizuno et al., 2000).

Die in vivo Relevanz der in vitro Bindung von BSP an Osteoklasten wurde durch immunohistochemische Aufnahmen, die zwar die Anwesenheit, aber keine Akkumulierung von BSP in der Knochenmatrix direkt gegenüber von resorbierenden Osteoklasten zeigten, abgeschwächt (Flores et al., 1992). Während eine reduzierte Sulfatierung von BSP keinen Einfluss auf die Bindung an Osteoblasten hat (Mintz et al., 1994), verliert teilweise dephosphoryliertes Protein seine Bindungsfähigkeit für Osteoklasten. Da BSP hierbei von der Osteoklasten spezifischen Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) dephosphoryliert wurde, könnte es sich in vivo um einen Regulationsprozess handeln, mit dem die Osteoklasten ihre Anheftung an die Knochenoberfläche steuern (Ek-Rylander et al., 1994). Mit verschiedenen in vitro Knochenresorptionsassays konnte gezeigt werden, dass BSP konzentrationsabhängig die Resorption fördert (Ross et al., 1993, Raynal et al., 1996), während verschiedene RGD-Sequenz enthaltende Peptide einen hemmenden Einfluss auf die Resorption hatten (van der Pluijm et al., 1994).

Zellbindungsassays mit normalen Knochenzellen und mit Fibroblasten unter Verwendung von proteolytischen BSP-Fragmenten, die bei der Aufreinigung des Proteins aus serumfreien

Zellkulturüberständen der BSP-exprimierenden Ratten Osteosarkomzell-Linie UMR-106-BSP entstanden sind, haben gezeigt, dass BSP-Fragmente ohne die RGD-Sequenz an die Zellen binden, ohne dass diese Adhäsion von RGD-Peptiden gehemmt werden kann. Somit besteht auch die Möglichkeit einer RGD-unabhängigen Zelladhäsion (Mintz et al., 1993).

Die Transkription von BSP wird durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason erhöht, während 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ den BSP mRNA Spiegel in vitro vermindert (Oldberg et al., 1989, Chen et al., 1996, Bellows et al., 1999, Chen et al., 1999). Aufgrund der Steigerung der BSP-Expression nach Glucocorticoid-Zugabe, die zur Differenzierung von Osteoblasten führt, wurde postuliert, dass BSP an der anabolen Phase des Knochenumbaus beteiligt ist (Heinegård et al., 1989 b).

Außerdem hat BSP eine sehr hohe Affinität für Hydroxlyapatit und könnte deshalb am Mineralisierungsprozess des Knochens beteiligt sein. Die Dissoziationskonstante (K_d) von BSP aus der Ratten Osteosarkomzell-Linie UMR-106-BSP zu Hydroxlyapatit beträgt $2,6 \times 10^{-9}$ M (Stubbs et al., 1997). Das Protein fungiert in einem Agarosegelsystem als de novo Nukleator für Hydroxlyapatitkristalle (Hunter et al., 1993), eine Eigenschaft, die nach chemischer Modifizierung der Carboxylgruppen verloren geht (Hunter et al., 1994). Die Bindungseigenschaften für Hydroxlyapatit wurden den Glutaminsäure-reichen Regionen des Moleküls zugeschrieben (Goldberg et al., 1996), wobei gezeigt werden konnte, dass die posttranslationalen Modifikationen des Proteins ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (Stubbs, 1996). Parallel konnte die Bindung von Osteoblasten an Hydroxlyapatit sowohl durch BSP aus bovinen Knochen als auch durch das synthetische Peptid Glu₇-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr vermittelt werden, wobei die Zellbindung selektiv durch Zugabe eines RGD-haltigen Peptids blockiert werden konnte (Fujisawa et al., 1997). In vitro konnte gezeigt werden, dass in bovinen Knochenzellen die BSP mRNA bei Beginn der Mineralisierung 140-fach erhöht wird (Ibraki et al., 1992). Verschiedene in vitro und in vivo Untersuchungen haben bestätigt, dass BSP entweder gleichzeitig mit (Yao et al., 1994, Cowles et al., 1998) oder unmittelbar vor der Mineralisierung des Knochens (Roach, 1994, Arai et al., 1995, Chen et al., 1992) nachweisbar ist. In einem bovinen in vitro Modell konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Antikörpern gegen BSP die Differenzierung und die Mineralisierung der Osteoblasten unterdrückt (Cooper et al., 1998).

Ob BSP sowohl am Knochenaufbau als auch an der Knochenresorption beteiligt ist, oder ob nur eine dieser gegensätzlichen Funktionen in vivo relevant ist, ist noch unklar. Knockout Mäuse, die keine BSP mRNA exprimierten, zeigten im Alter von sechs Wochen geringfügige

Knochen- und Zahnabnormalitäten (Aubin et al., 1995). Eine umfassende Charakterisierung der Tiere wurde bis jetzt nicht publiziert.

Klinische Studien haben gezeigt, dass *Staphylococcus aureus*, isoliert aus Patienten mit Infektionen von Knochen und Gelenken (Osteomyelitis und septische Arthritis) selektiv an BSP bindet, während *Staphylococcus aureus* Zellen von Kontrollpatienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen kaum an BSP adhärieren (Rydén et al., 1987, 1989, 1990). An der Bindung sind ein *Staphylococcus aureus* Zelloberflächenprotein von 97 kDa (Yacoub et al., 1994, Tung et al., 2000) und eine kurze N-terminale Sequenz aus basischen und hydrophoben Aminosäuren des BSPs (TYFYPPPLKRFP) beteiligt (Rydén et al., 1997). Da sowohl die RGD-Sequenz als auch die Glutaminsäure-reichen Regionen an dieser Bindung nicht beteiligt sind, könnte das BSP die Bakterien im Knochen an Zellen binden oder am Hydroxylapatit verankern.

Mit Hilfe von Immunoassays konnten erhöhte Spiegel von BSP im Serum und in der Gelenkflüssigkeit von Schwangeren (Ohno et al., 1995) und von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Saxne et al., 1995, Larsson et al., 1997), sowie in Seren von Patienten mit metabolischen und bösartigen Knochenerkrankungen (Seibel et al., 1996, Karmatschek et al., 1997, Woitge et al., 1999) nachgewiesen werden. Nach Kniegelenksverletzungen blieb die BSP-Menge in der Gelenkflüssigkeit für ein halbes Jahr erhöht (Lohmander et al., 1996). BSP hat somit als Knochenumbau-marker diagnostischen Wert.

2.2.5 Klinische Studien zur Analyse von BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen

Über 80% der Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs leiden an Knochenmetastasen, die signifikant zur Morbidität und Mortalität der Krankheit beitragen (Sklaroff et al., 1968, Hoffman et al., 1972, Galasko et al., 1969). Der Knochen ist der bevorzugte Ort für metastatische Mammakarzinomzellen (Haagensen, 1974), wobei man den Mechanismus, der für diesen Osteotropismus verantwortlich ist, nicht genau kennt.

Bone Sialoprotein wurde mittels immunohistochemischer Färbungen im Cytosol und auf der Zelloberfläche von malignen Brustkrebszellen nachgewiesen. Dabei zeigte mit Mikrocalcifizierungen assoziiertes Gewebe die höchste Immunreaktivität, während normales Brustdrüsengewebe und gutartige Tumore nicht oder nur schwach gefärbt waren (Bellahcène et al., 1994). In duktalem Tumoren war die BSP-Menge gegenüber lobulären

Tumoren signifikant erhöht. Zwischen dem Östrogenrezeptorstatus, dem Progesteronrezeptorstatus sowie dem Alter der Patientinnen und der BSP-Immunreaktivität ergab sich keine Korrelation (Bellahcène et al., 1996 d). Dass BSP von den Brusttumorzellen selbst produziert wird, konnte auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Bellahcène et al., 1996 a, Gillespie et al., 1997).

Die Untersuchung der BSP-Expression in verschiedenen Brustkrebszell-Linien führte zu kontroversen Ergebnissen. Während Sung et al. (1998) und Sharp et al. (1999) keine BSP-mRNA und kein Protein in verschiedenen Brustkrebszell-Linien detektieren konnten, zeigten Bellahcène et al. (1996 a) und Gillespie et al. (1997) positive Expressionsdaten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Proteinextrakte der Zellen ergaben in der Immunoblotanalyse eine prominente Bande oberhalb von 97 kDa und mehrere kleinere Banden. BSP wurde bei allen Östrogenrezeptor-positiven Zellen (MCF-7, T47-D) auf der Zelloberfläche detektiert, während das Protein bei der Östrogenrezeptor-negativen Zell-Linie MDA-MB-231 nur intrazellulär gefunden wurde. Klinische Studien haben gezeigt, dass Östrogenrezeptor-positive maligne Brusttumore mit höherer Wahrscheinlichkeit im Knochen metastasieren als Östrogenrezeptor-negative Tumore (Coleman et al., 1987). Mit verschiedenen in vitro Assays wurde gezeigt, dass BSP die Adhäsion, Migration und Proliferation der Brustkrebszell-Linie MDA-MB-231 fördert, wobei für die Adhäsion und Proliferation hauptsächlich $\alpha_v\beta_5$ Integrin- und für die Migration $\alpha_v\beta_3$ Integrin- sowie Integrin-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen (Sung et al., 1998 a, b). In vivo konnten nur $\alpha_v\beta_3$ Integrine in normalem Brustgewebe, in Brusttumoren und in Knochenmetastasen gefunden werden (Liapis et al., 1996). Außerdem konnte die Bindung der MDA-MB-231 Zellen sowohl an BSP als auch an unterschiedliche in vitro Matrices für die mineralisierte Knochenmatrix (serumfreies konditioniertes Medium von humanen trabekulären Knochenzellen, Knochenscheiben aus bovinen Schädelknochen, Gefrierschnitte von neonatalen trabekulären Knochen der Maus) durch Zugabe von cyclischen, BSP-ähnlichen RGD-Peptiden gehemmt werden. Deshalb werden diese als antiadhäsive Agentien für Brustkrebszellen in vivo diskutiert (van der Pluijm et al., 1996).

Im Zusammenhang mit der erhöhten BSP-Expression von Brusttumorzellen, die sich in der Nähe von Mikrocalcifizierungen befinden, wurde postuliert, dass BSP auch hier als Nukleator für Hydroxylapatitkristalle fungiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Kristalle, ähnlich wie BSP, im Cytoplasma und an der Zellmembran von Brusttumorzellen zu finden sind (Ahmed, 1975) und dass stärker mineralisierte Strukturen Zellkerne von Brusttumorzellen enthalten und somit "Fossile" der Krebszellen darstellen, die von der mineralisierten Matrix eingeschlossen wurden (Castronovo et al., 1998).

Klinische Untersuchungen unter Verwendung von ca. 500 verschiedenen Biopsien haben gezeigt, dass Patientinnen mit BSP-positiven Tumoren mit größerer Wahrscheinlichkeit (22%) Knochenmetastasen entwickelten als Patientinnen mit BSP-negativen Tumoren (7%). Bei BSP-positiven Tumoren lag die Überlebenswahrscheinlichkeit nach zehn Jahren bei 50%, bei BSP-negativen Tumoren dagegen bei 70% (Bellahcène et al., 1996 c, d).

Die Bestimmung des BSP-Gehalts in präoperativ entnommenen Seren von ca. 400 Patientinnen mit gutartigen oder malignen Mammakarzinomen und die Dokumentierung der Metastasenbildung über einen Zeitraum von zwei Jahren führte zu dem Ergebnis, dass 90% der Patientinnen, die Knochenmetastasen entwickelten, zuvor einen erhöhten BSP-Spiegel im Serum aufwiesen (Diel et al., 1999). Wurden die Patientinnen mit Osteoporose-Medikamenten behandelt, reduzierte sich der Serum-BSP-Spiegel innerhalb von vier Tagen auf 40% des Normalwertes (Seibel et al., 1996). Ob die erhöhte BSP-Menge im Serum vom Mammakarzinom selbst produziert wird oder durch Mikrometastasierung aus dem Knochen freigesetzt wird, ist noch unklar.

Obwohl BSP als prognostischer Marker für die Knochenmetastasierung beim Mammakarzinom klinische Relevanz hat, ist die genaue Funktion des Proteins in diesem Kontext noch unklar. Eine Hypothese hierzu ist, dass die Tumorzellen über $\alpha_v\beta_3$ Integrine BSP auf ihrer Oberfläche binden, welches dann über seine Glutaminsäure-reichen Regionen die bevorzugte Anheftung der Zellen an Hydroxylapatit des Knochens vermittelt (Bellahcène et al., 1997 b, Waltregny et al., 2000). Dafür spricht u. a., dass BSP in Knochenmetastasen von Brustkrebspatientinnen gefunden wurde, während viscerale Metastasen kein BSP exprimierten (Waltregny et al., 2000). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass BSP die Adhäsion und Migration von humanen Endothelzellen vermittelt und die Angiogenese fördert, eine Eigenschaft, die für das Tumorwachstum und die Verbreitung von Metastasen hilfreich ist (Bellahcène et al., 2000). Außerdem wurde die Bindung von BSP an den Komplement Faktor H im Serum nachgewiesen. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass BSP in Assoziation mit Faktor H verschiedene Tumorzellen vor der Zerstörung durch das Komplement System in vitro schützt (Fedarko et al., 2000).

2.3 Glykosylierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen

Eine häufige posttranslationale Modifizierung in eukaryotischen Zellen ist die Glykosylierung von Proteinen. Hinsichtlich der Art der Bindung an das Protein und der Biosynthese lassen sich zwei Strukturgruppen von Glykanen unterscheiden. Die N-Glykane sind über

N-Acetylglukosamin N-glykosidisch mit dem Amidstickstoff von Asparagin verknüpft, wobei die Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx = alle Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin oder Asparaginsäure) erforderlich ist (Marshall, 1972). O-Glykane sind über N-Acetylgalaktosamin O-glykosidisch an die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin gebunden. Hierfür ist keine typische Konsensussequenz in der Umgebung der Serine und Threonine bekannt (Gooley et al., 1994; Nehrke et al., 1996). Da Proteine erst nach N-Glykosylierung, Ausbildung der Tertiärstruktur und Oligomerisierung mit O-Glykanen modifiziert werden, ist die O-Glykosylierung von Serinen und Threoninen von der Konformation des Proteins und der Zugänglichkeit der Aminosäuren auf der Protein-oberfläche abhängig. Neben diesen am weitesten verbreiteten, auch als mucinartige Kohlenhydrate bezeichneten O-Glykanen, gibt es eine Vielfalt weiterer O-Glykane (z. B. Proteoglykane), die sich in der Art des proteingebundenen Zuckers und der für die Bindung an das Protein verwendeten Aminosäuren unterscheiden. Die Glykosylierung ist speziesspezifisch, gewebespezifisch, zelltypspezifisch, entwicklungsspezifisch und protein-spezifisch. Dennoch treten Glykoproteine nicht als einheitliche Strukturen auf, sondern bestehen aus einer Mischung verschiedener Glykoformen, die sich durch Anzahl, Anordnung und Sequenz der gebundenen Glykane unterscheiden, was bedeutet, dass an einer Aminosäure auch unterschiedliche Kohlenhydratseitenketten auftreten können (Mikro-heterogenität). Ein Teil der Proteinglykosylierungsreaktionen findet im ER-Lumen statt, die weiteren in den Lumina der cis-, mittleren- und trans-Golgivesikel. Die Monosaccharid-einheiten der O-Glykane werden einzeln an Proteine angefügt, wobei für jeden Transfer ein spezifisches Enzym zuständig ist. Bei den N-Glykanen wird zuerst ein Komplex aus 14 Zuckermolekülen auf einen Asparaginrest übertragen, welcher danach in einer definierten Reihenfolge prozessiert wird, wobei jede Hinzufügung und Entfernung von Glykanen von unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird (Fukuda et al., 1994). Die Biosynthesewege für N-Glykane und mucinartige O-Glykane sind unter Punkt 2.3.1 und 2.3.2 kurz erläutert.

2.3.1 Biosynthese der N-Glykane

Zunächst wird im ER eine allen N-Glykanen gemeinsame verzweigte Oligosaccharidvorstufe, bestehend aus drei Glukosen, neun Mannosen und zwei N-Acetylglukosaminen, von verschiedenen membranständigen Enzymen synthetisiert. Fünf dieser Monosaccharide, drei Mannosen und zwei N-Acetylglukosamine, sind in allen N-Glykanen konserviert (s. Abb. 3). Die Oligosaccharidvorstufe ist über einen Pyrophosphatrest an Dolichol, ein aus 75-95 Kohlenstoffatomen bestehendes, membranständiges, ungesättigtes Lipid, gebunden und ragt in das ER-Lumen hinein. Von hier aus wird das komplette Oligosaccharid durch eine

Oligosaccharidtransferase auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz der neu synthetisierten Polypeptidkette übertragen. Unmittelbar danach werden drei Glukosereste und ein Mannoserest entfernt. Die weitere Prozessierung der N-Glykanketten findet im Golgiapparat statt, wo verschiedene Enzyme in den Vesikeln des cis-, mittleren- und trans-Golgiokompartments die schrittweise terminale Entfernung und Anheftung von Monosacchariden katalysieren, wobei das Produkt der vorhergehenden Reaktion das Substrat für die nächste Reaktion darstellt. Hierbei entstehen die drei Grundtypen von N-Glykanen, Komplex-Typ, Mannosereicher-Typ und Hybrid-Typ (s. Abb. 3) in Abhängigkeit von der Konformation des Proteins und den zur Verfügung stehenden Enzymen. Bei Komplex-Typ N-Glykanen werden drei weitere Mannosereste abgespalten, ein N-Acetylglukosamin angefügt, zwei weitere Mannosereste abgespalten und an die dabei entstehende konservierte Grundstruktur weitere N-Acetylglukosamine, Galaktosen, N-Acetylneuraminsäuren und Fukosen angefügt. Mannosereiche N-Glykane entstehen zum einen, wenn die Mannosidasen nicht mit dem Oligosaccharid reagieren können, weil es durch die Konformation der Proteindomäne nicht zugänglich ist oder wenn die entsprechenden Mannose abspaltenden Enzyme nicht vorhanden sind. Andererseits kann auch die nach der Abspaltung der drei Mannosereste folgende Anheftung eines N-Acetylglukosaminrestes fehlen, was zum Abbruch der Synthese an dieser Stelle führt, da das nachfolgende Enzym die Anwesenheit des Glukosaminrestes als Substrat benötigt. Mannosereiche N-Glykane gleichen somit den Oligosaccharidvorstufen und Intermediaten zu Beginn der Synthese. Hybrid-Typ N-Glykane entstehen, wenn nach der Anheftung des ersten N-Acetylglukosamins die zwei weiteren Mannosereste nicht entfernt werden können, sodass eine weitere Verlängerung nur an dem N-Acetylglukosaminhaltigen Ast stattfinden kann. An dieser Stelle des Syntheseweges kann auch ein N-Acetylglukosamin in β 1,4-Position an die zentrale Mannose der konservierten Grundstruktur gebunden werden, wodurch dem entstehenden GlcNAc β 1,4-geteilten (bisecting) N-Glykan weitere Prozessierungsmöglichkeiten offen stehen, die letztlich zur Synthese von GlcNAc β 1,4-geteilten Komplex-Typ N-Glykanen führen (Kornfeld et al., 1985).

Die hohe Vielfalt der N-Glykane resultiert aus der variablen Anzahl an Seitenketten oder Antennen, die von der Pentasaccharid Grundstruktur ausgehen können, kombiniert mit den zahlreichen Variationsmöglichkeiten innerhalb dieser Antennen. In eukaryotischen Zellen treten biantennäre, 2,4-verzweigte triantennäre und tetraantennäre N-Glykane am häufigsten auf, während monoantennäre, 2,6-verzweigte triantennäre und pentaantennäre Strukturen selten vorkommen (Endo et al., 1979, Yamashita et al., 1982, 1984). Die Bestandteile der Seitenketten von Komplex-Typ und Hybrid-Typ N-Glykanen können grob in drei Gruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe besteht aus den häufig auftretenden N-Glykanen mit

subterminalen Galaktosen, die über N-Acetylglukosamine mit der core-Struktur verknüpft sind und die aufgrund der terminalen Anheftung einer N-Acetylneuraminsäure in α 2,6- oder α 2,3-Stellung, einer Fucose oder einer α 1,2 Glaktose nicht weiter verlängert werden können. Zur zweiten Gruppe gehören lineare oder verzweigte Poly-N-Acetylglukosaminketten, die aus N-Acetylglukosamin-Einheiten ($\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow$) bestehen. Gruppe 3 besteht aus $\text{GalNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow$ Strukturen (N-Acetylglukosamin, bei dem Gal durch GalNAc ersetzt ist), die entweder durch N-Acetylneuraminsäuren oder durch Sulfatreste an der 3'-OH- oder 4'-OH-Gruppe des N-Acetylglukosamins terminiert sind (Fukuda et al., 1994).

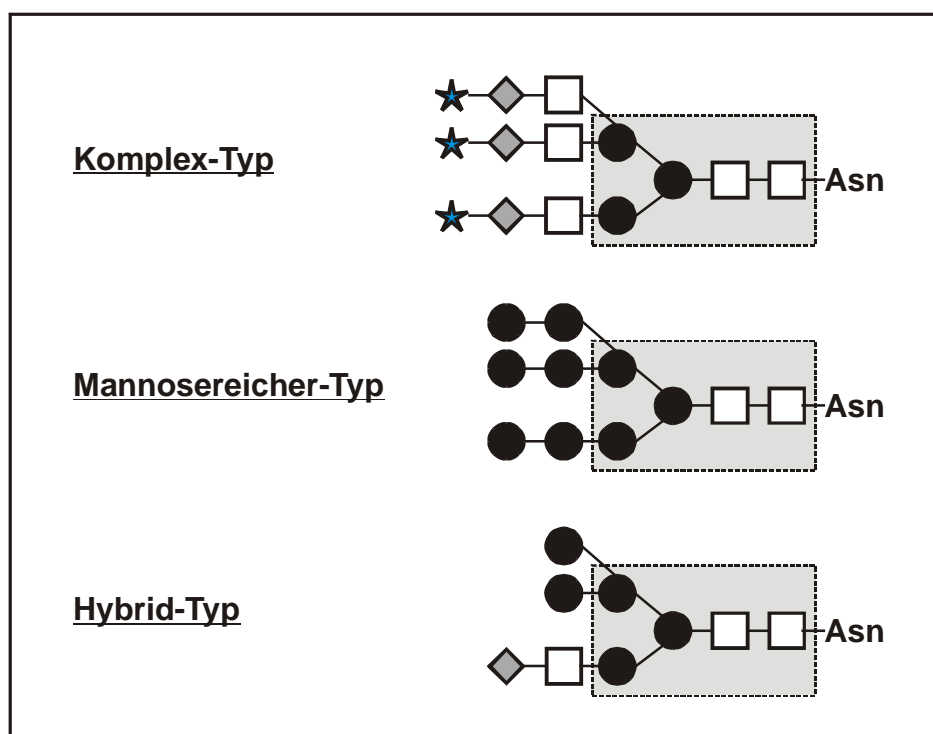






Abb. 3: Die drei Grundtypen der N-Glykane.

Das in allen N-Glykanen konservierte Pentasaccharid (core-Struktur) ist grau unterlegt.

-  N-Acetylglukosamin
-  Mannose
-  Galaktose
-  N-Acetylneuraminsäure

Im Zusammenhang mit der veränderten Glykosylierung von Proteinen in Tumorzellen ist eine in Folge von gesteigerter Expression verschiedener Fucosidasen erhöhte Fukosylierung von N-Glykanen beobachtet worden. Fukosen sind in humanen Proteinen α 1,2 an terminale

Galaktosen, α 1,3 oder α 1,4 an subterminale N-Acetylglukosaminreste oder in α 1,6-Stellung an das mit dem Asparaginrest verknüpfte N-Acetylglukosamin (core-Fukosylierung) gebunden (Staudacher et al., 1999).

2.3.2 Biosynthese der O-Glykane

Bei der Biosynthese der O-Glykane wird zuerst mit Hilfe von Polypeptid N-Acetyl-galaktosaminyltransferasen die Übertragung von N-Acetylgalaktosamin auf die Hydroxylgruppen der Serine oder Threonine katalysiert, wobei die entstehenden Strukturen als Tn-Antigen bezeichnet werden. Diese Serin/Threonin gebundenen N-Galaktosaminylreste bilden den Ausgangspunkt für verschiedene Vorläuferstrukturen, die als *core1* - *core4* bezeichnet werden (s. Abb. 4) (Schachter et al., 1982). Durch den Transfer eines Galaktosylrestes mittels *core1*- β 1,3 Galaktosyltransferase entsteht das *core1*-Disaccharid Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, das auch als Thomson-Friedenreich oder TF-Antigen bezeichnet wird. Aus der *core1* Struktur entsteht durch Übertragung eines N-Acetylglukosamins mit Hilfe der *core2*- β 1,6 N-Acetylglukosaminyltransferase das *core2*-Trisaccharid GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc. Das *core3*-Disaccharid GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc entsteht, wenn das Serin/Threonin gebundene N-Acetylgalaktosamin durch die *core3*- β 1,3 N-Acetylglukosaminyltransferase in Position 3 mit einem N-Acetylglukosaminylrest versehen wird. Die *core3*-Struktur kann mittels *core4*- β 1,6 N-Acetylglukosaminyltransferase in das *core4*-Trisaccharid GlcNAc β 1 \rightarrow 6 (GlcNAc β 1 \rightarrow 3) GalNAc überführt werden. Bei humanen Proteinen sind *core1* und *core2* die häufigsten Strukturen, die fast ubiquitär vorkommen (Brockhausen, 1999). *Core3* kommt v. a. im Gastrointestinaltrakt vor und ist dort die dominierende Struktur. *Core4*-Strukturen treten auch im Colon auf, sind dort aber wesentlich seltener als *core3*-Strukturen zu finden (Hanski et al., 1992). Weitere *core*-Strukturen (5-8) wurden bisher nur in speziellen Geweben gefunden und sind daher seltener vertreten (*core5* im Darm von Neugeborenen und im Adenokarzinom des Colons (Hounsell et al., 1985, Kurosaka et al., 1983), *core6* im Ovar (Yazawa et al., 1986), *core7* in bovinem Drüsenschleim aus der Oberkieferregion (Chai et al., 1992), *core8* in kleinen Mengen in humanem Bronchialschleim (van Halbeek et al., 1994)).

Die *core*-Strukturen können zu linearen oder verzweigten Oligosaccharidketten verlängert werden, deren Strukturelemente aus Typ 1 (Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc) oder Typ 2 (Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNAc) Laktosaminen bestehen. Lineare Ketten bezeichnet man als i-Antigen, verzweigte als I-Antigen. Während Typ 2 Laktosaminbausteine lange repetitive Ketten bilden, treten Typ 1 Laktosamine nicht repetitiv oder als terminale Struktur auf Typ 2 auf.

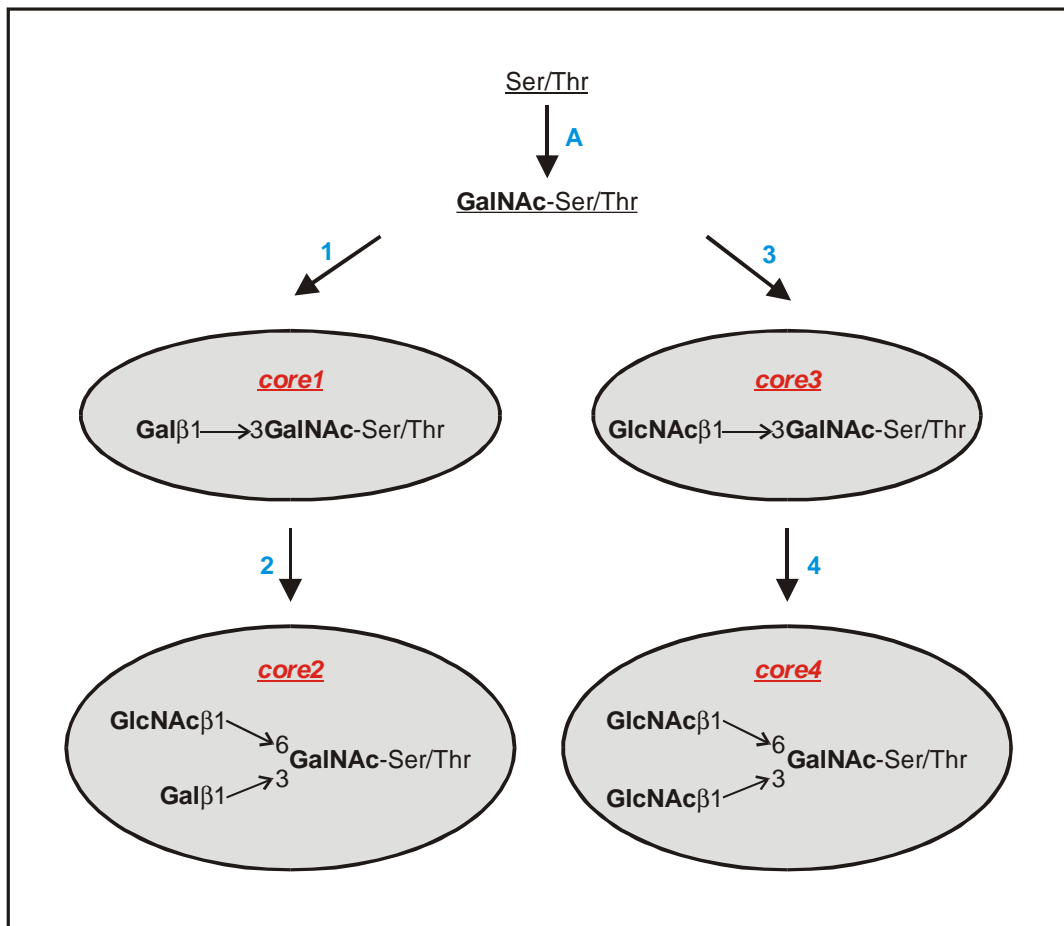


Abb. 4: Biosynthese der O-Glykan core-Strukturen 1-4.

Modifiziert nach Fukuda et al., 1994.

A ⇒ Polypeptid N-Acetylgalaktosaminyltransferasen

1 ⇒ core1-β1,3 Galaktosyltransferase

2 ⇒ core2-β1,6 N-Acetylglukosaminyltransferase

3 ⇒ core3-β1,3 N-Acetylglukosaminyltransferase

4 ⇒ core4-β1,6 N-Acetylglukosaminyltransferase

Werden N-Acetylneuraminsäuren mittels Sialyltransferasen in α2,6- oder α2,3-Stellung auf Galaktosen oder N-Acetylglukosamine der wachsenden Oligosaccharidketten übertragen, ist dies ein terminaler Schritt, d. h. die Strukturen werden nicht weiter verlängert. Das gleiche gilt für terminale Sulfatreste, die mit der 3'-OH-Gruppe von Galaktosen oder mit der 6'-OH-Gruppe von N-Acetylglukosaminen verestert sein können (Hanski et al., 1992, Brockhausen et al., 1995, 1999). Frukosen können in α1,2-, α1,3- und α1,4-Stellung durch Frukosyltransferasen auf Galaktosen oder N-Acetylglukosaminreste der Ketten übertragen werden, was z. B. die Voraussetzung für die Ausbildung der Blutgruppenantigene ist (Hakamori, 1981).

In Tumoren haben O-Glykane eine wichtige Funktion bei der Adhäsion und Invasion sowie dem Überleben von Krebszellen im Blut. Häufig sind die O-Glykan-Strukturen in Tumoren verändert, weil entweder die Proteinstruktur in malignen Zellen anders vorliegt oder Art und Menge der Glykosidasen verschieden ist. Dies kann zur Veränderung der Antigenität des Proteinkerns und somit zur Exposition tumorspezifischer Peptidepitope führen. So ist z. B. in der Mammakarzinomzell-Linie T47-D die Sialyltransferase-Aktivität erhöht, während kein *core2* Enzym vorhanden ist, was zu kürzeren, stark sialinisierten Strukturen führt (Brockhausen et al., 1995).

2.4 Ziel der Arbeit

Bisher wurden fast alle für BSP beschriebene Aktivitäten mit Proteinen oder Proteinfragmenten ermittelt, die entweder aus bakteriellen Expressionssystemen stammten und somit keine posttranslationalen Modifizierungen besaßen, oder mit aus Knochen isoliertem BSP, das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde.

Das Ziel dieser Arbeit ist die biochemische und funktionelle Charakterisierung von humanem BSP, das rekombinant in verschiedenen Zell-Linien hergestellt werden soll und sich im Vergleich zu dem in früheren Studien verwendeten Material durch das Vorliegen seiner nativen Form und die Existenz zelltypspezifischer posttranslationaler Modifizierungen unterscheidet.

Bei der biochemischen Charakterisierung soll der Schwerpunkt in der Untersuchung der Proteinkonformation und der posttranslationalen Modifizierungen liegen, wobei eine vergleichende Glykananalyse von BSP aus humanen Knochen und rekombinantem BSP erfolgen soll.

Die funktionelle Charakterisierung soll zwei Zielrichtungen verfolgen: Zum einen soll die Funktion von BSP im Knochen im Hinblick auf seine Lokalisation in der mineralisierten Knochenmatrix, seine potenziellen Bindungspartner und seine Hydroxylapatitaffinität untersucht werden. Andererseits sollen Studien mit humanen Brustkrebszell-Linien zur näheren Beschreibung der Funktion von BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Allgemeine Methoden

3.1.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen und unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Puffer und Temperatur) eingesetzt. Für Testverdaus wurden ca. 2 µg DNA mit 2-10 Units Enzym für eine Stunde verdaut, für präparative Zwecke wurden 10-20 µg DNA mit 10-20 Units Enzym über Nacht geschnitten.

3.1.1.2 Ligation

Vektor und DNA-Fragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt, wobei die Gesamt DNA-Menge bei ca. 100 ng lag. In einem Reaktionsansatz von insgesamt 10 µl wurden Vektor und DNA-Fragment durch Hinzugabe von 5 mM ATP, 400 "NEB-Units" T4-DNA-Ligase und Ligationspuffer der Firma New England Biolabs über Nacht bei 16°C ligiert.

3.1.1.3 Transformation

Jeweils 4 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenten *E. coli* TOP10F'-Zellen (Invitrogen) und 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 s bei 42°C) wurden die Bakterien zwei min auf Eis gestellt, mit 450 µl SOC-Medium (Invitrogen) versetzt und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl, 200 µl und der abzentrifugierte Rest der Bakteriensuspension auf Agarplatten (LB-Agar von GIBCO) mit Ampicillin (200 µg/ml) ausplattiert, die dann über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert wurden. Zur Blau-Weiß-Selektion mit dem lacZ-System wurden die Agarplatten vor Ausplattierung der Bakterien mit 50 µl X-Gal (20 mg/ml) und 10 µl IPTG (0,1 M) versetzt.

3.1.1.4 Präparation von Plasmid DNA

Für Test-Restriktionsspaltungen bei Klonierungen wurde die Plasmid DNA nach einer modifizierten Methode von Berghammer et al. (1993) isoliert. Dazu wurden Einzelkolonien von Agarplatten in 2 ml ampicillinhaltigem (200 µg/ml) LB-Medium (GIBCO) über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Abzentrifugation von 1,5 ml dieser stationären Übernachtskultur in einer Eppendorfzentrifuge (1 min, 12000 g) wurden die sedimentierten Bakterien in 50 µl Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0, 15% (w/v) Sucrose, 2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml Rnase, 0,1 mg/ml BSA) resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 40 s im 100°C Wasserbad gekocht und für eine min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellreste für 20 min und 12000 g sedimentiert und der plasmidhaltige Überstand in eine neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Aufbewahrung von Plasmid DNA erfolgte bei -20°C.

Plasmid DNA für Sequenzierungen oder für die Transfektion humaner Zell-Linien wurde mit kommerziellen Kits (Macherey-Nagel bzw. QIAGEN) nach den Protokollen der Hersteller aufgereinigt.

3.1.1.5 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Von einer 1:100 Verdünnung der gelösten Plasmid DNA wurde die optische Dichte bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) fotometrisch bestimmt. Bei gleichmäßiger Basenverteilung und 1 cm Schichtdicke der Küvette entspricht eine bei 260 nm gemessene optische Dichte von 1 einer DNA Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient aus O. D. ₂₆₀ und O. D. ₂₈₀ sollte bei sauberen DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,9 liegen. Darunter liegende Werte zeigen die Anwesenheit von Verunreinigungen mit Proteinen an.

3.1.1.6 Agarosegelelektrophorese

Je nach Länge der DNA-Fragmente wurde Plasmid DNA mittels 0,8-2%igen Agarosegelen elektrophoretisch in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,4) aufgetrennt. Die Agarose wurde unter Aufkochen in TAE-Laufpuffer gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA wurde vor Beladung der Gele in entsprechendem Volumen sechs-fach konzentrierten Probenpuffers (0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40%

Glycerol, 10 mM EDTA) resuspendiert. Als Standard wurde die 1 kb DNA-Leiter von GIBCO parallel mit aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

3.1.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus den Agarosegelen ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneClean-Kits (BIO 101) nach Angaben des Herstellers aus den Agaroseblöckchen isoliert.

3.1.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde vom Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln auf einem ABI Prism 377 Sequenzierer unter Verwendung des *Taq FS DyeDeoxy-terminator cycle sequencing* Kits (Perkin Elmer/Applied Biosystems) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden pro Ansatz 150-300 ng DNA mit 10 pmol Sequenzierprimer eingesetzt. In Tabelle 1 sind die für die Sequenzierung der BSP cDNA und der in den Expressionsvektor pCEP-Pu klonierten Fusionspeptidelemente verwendeten Primer aufgelistet.

Bezeichnung	Bindungsstelle	Sequenz
T3 (sense)	pBlueskript SK	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7 (antisense)	pBlueskript SK	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
SeqU (sense)	pCEP-Pu (5'-UTR)	5'-TAGTGAACCGTCAGATCT-3'
Rev2 (antisense)	pCEP-Pu (3'-UTR)	5'-CTGGATCCGGCCTTGCC-3'
BSPm (sense)	BSP cDNA Mitte	5'-GCGAAGCAGAAGTGGATG-3'
BSPm (antisense)	BSP cDNA Mitte	5'-CTGGTGCCGTTTATGCCTTG-3'
COMPQM3 (antisense)	COMP cDNA N-terminal	5'-GTCTTGCTCATTAGGGACTC-3'
GSTm (sense)	GST aus pGEX-3X	5'-CCAGCAAGTATATAGCATGGC-3'

Tab. 1: Für Sequenzierungen verwendete Primer.

3.1.1.9 Glycerinkulturen

Alle erfolgreich transformierten Bakterien wurden als Glycerin-Stammkulturen konserviert, indem jeweils 800 µl einer stationären Übernachtskultur eines Klons mit 200 µl Glycerin gründlich durchmischt und sofort in Trockeneis eingefroren wurden. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C. Beim Auftauen von Glycerin-Stammkulturen wurde mit einer sterilen Impföse eine kleine Menge der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit 200 µg/ml Ampicillin transferiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

3.1.2 Herstellung und Einführung von Fusionspeptidsequenzen in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu

Zur Erleichterung der Aufreinigung von rekombinantem BSP wurden verschiedene Fusionspeptidsequenzen hinter das BM-40 Signalpeptid der multiplen Klonierungsstelle des eukaryotischen Expressionsvektors pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) kloniert. Das GST-Element und das GST-FX-Element wurden durch PCR-Amplifikation der GST-Sequenz des pGEX-3X-Vektors (Pharmacia) hergestellt, wobei durch die Wahl der Primer am 5'-Ende eine *Spe* I und am 3'-Ende eine *Nhe* I-Schnittstelle eingeführt wurde. Primer (MWG) und PCR-Bedingungen waren wie folgt:

<i>Spe</i> I-GST-sense:	5'-GCCCAGTAGTTATGTCCCCTATACTAGG-3'
<i>Nhe</i> I-GST-antisense	5'-GCCCCGCTAGCTTTTGGAGGATGGTTCGC-3'
<i>Nhe</i> I-Faktor X-GST-antisense:	5'-GCCCCGCTAGCCCACGACCTTCGATC-3'

Pro 25 µl PCR-Ansatz wurden 100 ng pGEX-3X Template, 50 pmol von jedem Primer, 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), eine Unit Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) und 2,5 µl zehnfach konzentrierter Pfu-Reaktionspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) vermischt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte nach einer vierminütigen Anfangsdenaturierung bei 94°C über 30 Zyklen einem TRIO-Thermoblock von BIOMETRA unter folgenden Bedingungen: Denaturierung für 30 s bei 94°C, Anlagerung der Primer für 1 min bei 52°C, Kettenverlängerung für 2 min bei 72°C, Termination für 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. 3.1.1.6), die DNA-Fragmente daraus isoliert (s. 3.1.1.7) und zur Klonierung eingesetzt.

Die myc-Sequenz und die Schnittstellen für die Proteasen Enterokinase und Faktor X wurden aus einzelsträngigen sense und antisense Oligonukleotiden hergestellt, die nach Anlagerung der komplementären Basen am 5'-Ende eine *Spe* I und am 3'-Ende eine *Nhe* I-Schnittstelle in Form von einzelsträngigen Überhängen besaßen. Die Oligonukleotide wurden im Institut für Genetik der Universität zu Köln mit den in Tabelle 2 dargestellten Sequenzen synthetisiert.

Oligonukleotid	Sequenz
myc (sense)	5'-CTAGTTGACGTCGCCAGCAATGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGG-3'
myc (antisense)	5'-CTAGCCAGATCCTCTTCTGAGATGAG TTTTTGTTTCATTGCTGGCGACGTCAA-3'
Enterokinase (sense)	5'-CTAGTATGACTGGTGGACAGCAAATG GGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAG-3'
Enterokinase (antisense)	5'-CTAGCTTATCGTCATCGTCGTACAGAT CCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATA-3'
Faktor X (sense)	5'-CTAGTATGACTGGTGGACAGCAAATG GGTCGGGATATCGAAGGTCGTGGG-3'
Faktor X (antisense)	5'-CTAGCCCACGACCTTCGATATCCCGA CCCATTGCTGTCCACCAGTCATA-3'

Tab. 2: Für die Herstellung der Fusionspeptidelemente verwendete Oligonukleotide.

Die in 30% Ammoniak gelösten Oligonukleotide wurden in einer Speed Vac eingeeengt, in einem ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst und zur Abtrennung von kleineren Oligonukleotidsynthese-Zwischenprodukten auf eine mit Sephadex G-25 gepackte und TE, pH 7,5, äquilibrierte NAP-10-Säule (Pharmacia) gegeben. Oligonukleotide mit weniger als 10 bp wurden von der Gelfiltrationsmatrix am längsten zurückgehalten, sodass die größeren Oligonukleotide mit 1,5 ml TE, pH 7,5, zuerst eluiert werden konnten. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (s. 3.1.1.5). Zur Verbindung von zwei komplementären Einzelsträngen wurden jeweils 20 pmol der entsprechenden Oligonukleotide mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. In einem TRIO-Thermoblock von BIOMETRA wurden die DNA-Stränge für 4 min bei 95°C erhitzt und durch langsames Abkühlen (jeweils 3 min bei 86°C, 77°C, 68°C, 59°C, 5 min bei 50°C und jeweils 1 min bei 41°C, 32°C, 23°C und 14°C) miteinander verbunden. Anschließend wurden die

doppelsträngigen DNA-Elemente an den 5'-OH-Gruppen ihrer einzelsträngigen Überhänge mittels T4 Polynukleotid Kinase phosphoryliert. Dazu wurden jeweils 20 pmol der doppelsträngigen DNA-Moleküle, 1 µl 0,1 M ATP, 10 Units T4 Polynukleotid Kinase (NEB) und vom Hersteller mitgelieferter Reaktionspuffer mit Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt. Danach erfolgte die Phosphorylierung für 30 min bei 37°C und die Hitzeinaktivierung des Enzyms für 30 min bei 65°C.

Um die Religation des *Nhe* I geschnittenen pCEP-Pu Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende enzymatisch abgespalten. Hierzu wurden 2 µg Vektor DNA, eine Unit CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, NEB) und vom Hersteller mitgelieferter Reaktionspuffer mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung für eine Stunde bei 37°C und die Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 75°C.

Die schrittweise Ligation der phosphorylierten Fusionspeptidelemente mit 5'-*Spe* I und 3'-*Nhe* I Überhängen mit dem dephosphorylierten und mit *Nhe* I linearisierten pCEP-Pu Vektor (s. 3.1.1.2) führte zur Ausbildung einer defekten *Spe* I / *Nhe* I-Schnittstelle am 5'-Ende jedes Elements und einer intakten, für die weitere Klonierung verwendbaren *Nhe* I-Schnittstelle am 3'-Ende jedes Elements. Nach jeder Ligation mit einem Fusionspeptidelement wurde die korrekte Einfügung mittels Sequenzierung überprüft (s. 3.1.1.8).

Auf diese Weise wurden vier verschiedene Konstrukte hergestellt (GST-Enterokinase, GST-Faktor X, his₆-myc-Enterokinase, his₆-myc-Faktor X) (s. 4.1.1), wobei der Ausgangsvektor für die his₆-Konstrukte der his₆-pCEP-Pu-Vektor war (D. Segat, 1999).

3.1.3 PCR-Amplifikation und Klonierung der BSP cDNA

Die cDNA für humanes BSP wurde von Dr. Larry Fisher in Form des Plasmids B6-5g zur Verfügung gestellt (Fisher et al., 1990). B6-5g besteht aus dem pBluescript-Vektor, der die komplette cDNA-Sequenz für humanes BSP aus Osteoblasten enthält. Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurde die cDNA im B6-5g-Plasmid zuerst durchsequenziert (s. 3.1.1.8). Von diesem Plasmid aus wurde die BSP cDNA dann ohne eigenes Signalpeptid mittels PCR amplifiziert, wobei durch die Auswahl der Primer am 5'-Ende eine *Nhe* I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Not* I-Schnittstelle eingefügt wurde. Primer (MWG) und PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Nhe I BSP (sense): 5'-GCCCCGCTAGCCTTCTCAATGAAAAATTTGCATCG-3'

Not I BSP (antisense): 5'-CAATGACTGCGGCCGCTCACTGGTGGTGGTAGTAATTC-3'

Pro 25 µl PCR-Ansatz wurden 150 ng B6-5g Template, 100 pmol von jedem Primer, 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), eine Unit Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) und 2,5 µl zehn-fach konzentrierter Pfu-Reaktionspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) vermischt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte nach einer vierminütigen Anfangsdenaturierung bei 94°C über 30 Zyklen einem TRIO-Thermoblock von BIOMETRA unter folgenden Bedingungen: Denaturierung für 30 s bei 94°C, Anlagerung der Primer für 1 min bei 62°C, Kettenverlängerung für 2,5 min bei 72°C, Termination für 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. 3.1.1.6), die DNA-Fragmente daraus isoliert (s. 3.1.1.7) und vor der Klonierung in den pCEP-Pu-Expressionsvektor (Kohfeldt et al., 1997) mit *Nhe* I und *Not* I verdaut. Das korrekte Leseraster wurde mittels Sequenzierung überprüft (s. 3.1.1.8). Eine Karte des Expressionsvektors ist in Abb. 5 gezeigt (s. 4.4.1).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Herkunft und Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zell-Linien

Die verwendeten Zell-Linien wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturschalen (10 oder 15 cm Durchmesser, Falcon) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ adhärent kultiviert. Jeden dritten Tag wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versorgt. Konfluente Zellen wurden mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, durch Trypsin/EDTA-Behandlung (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS) abgelöst und im Verhältnis 1:5 neu ausgesät. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in Einfriermedium (10% FCS, 10% DMSO, 80% Kulturmedium) resuspendiert, wobei pro konfluenter 10 cm Kulturschale 2 ml Einfriermedium eingesetzt wurden. Die Lagerung erfolgte in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff.

In Tabelle 3 sind die verwendeten Zell-Linien mit den dazugehörigen Kulturmedien (GIBCO) aufgelistet.

Zell-Linie	Herkunft	Kulturmedium
Nieren, human, virustransformiert EBNA-293	Invitrogen	DMEM-F12, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,25 mg/ml G418 (Geneticin)
Osteosarkom, human SAOS-2	DSMZ	McCoy's 5A, 15% FCS, 2 mM L-Glutamin
Osteosarkom, human MG-63	ATCC	MEM mit Earles Salzen, 10%FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren
Osteosarkom, human MHH-ES1	DSMZ	RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin
Osteosarkom, Ratte UMR-108	ATCC	MEM mit Earles Salzen, 25 mM HEPES und Glutamax I, 10% FCS, 0,1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren
Mammakarzinom, human MCF-7	ATCC	MEM Eagle, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren, 1 mM Na-Pyruvat
Mammakarzinom, human T47-D	ATCC	RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 10 µg/ml bovines Insulin, 0,25% Glukose
Mammakarzinom, human ZR75-1	ATCC	RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 0,25% Glukose
Mammakarzinom, human MDA-MB-231	ATCC	RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin

Tab. 3: Herkunft und Kulturbedingungen der verwendeten Zell-Linien.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). American Type Culture Collection (ATCC).

3.2.2 Transfektion, Selektion und Ernte von serumfreien Zellkulturüberständen

Die rekombinante DNA wurde mit Hilfe des Fugene-Transfektionsreagenzes (Roche), einer Mischung aus nicht-liposomalen Lipiden in 80% Ethanol, in die verschiedenen Zell-Linien eingeführt. Dazu wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion auf 10 cm Kulturschalen verdünnt ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50-80% Konfluenz aufwiesen. In einem Eppendorfgefäß wurden 100 µl serumfreies Medium mit 6 µl Fugene für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 2 µg DNA vorgelegt,

zu der dann die verdünnte Fugenlösung aus Gefäß 1 tropfenweise hinzugegeben wurde. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tropfenweise zu dem serumhaltigen Kulturmedium der Zellen gegeben.

Transient transfizierte Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion für zwei Tage in serumfreiem Medium kultiviert, in dem dann die Existenz des rekombinanten BSPs mittels SDS-PAGE (s. 3.3.1.2) und Immunoblot (s. 3.4.2) überprüft wurde. Bei den Zellen, die das Expressionsplasmid episomal erhalten sollten, wurde das Kulturmedium zur Selektion transfizierter Zellen zwei Tage nach Transfektion mit 0,5 µg/ml Puromycin versetzt. Nach 10-14 Tagen waren die nicht transfizierten Zellen abgestorben, sodass die BSP exprimierenden Zellen vermehrt werden konnten.

Damit die Proteine im FCS (hauptsächlich BSA) die Aufreinigung des rekombinanten BSPs nicht erschweren, wurden die BSP-sekretierenden Zellen nach Erreichen von Konfluenz unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Mit Ausnahme der EBNA-293 Zellen, die bis zu vier Wochen unter serumfreien Bedingungen leben konnten, starben alle anderen Zell-Linien nach 2-4 Tagen in Kulturmedium ohne Serum. Die serumfreien Kulturüberstände wurden jeden zweiten Tag gesammelt, auf die Existenz des rekombinanten BSPs überprüft und nach Zugabe von 1 mM des Proteaseinhibitors PMSF bei -20°C gelagert.

3.2.3 Zellkulturmodell für die mineralisierte Knochenmatrix

Die humane Osteosarkomzell-Linie SAOS-2 und die Ratten Osteosarkomzell-Linie UMR-108 wurden in Passage 5 nach Erreichen von Konfluenz auf 10 cm Kulturschalen für 1-3 Wochen unter täglichem Mediumwechsel postkonfluent kultiviert. Um die Bildung einer mineralisierten Knochenmatrix zu unterstützen, wurde das Kulturmedium in Anlehnung an Whitson et al. (1992) und McQuillan et al. (1995) mit 0,25 mM Ascorbinsäure und 10 mM β -Glycerophosphat supplementiert. Zum Vergleich wurden nur mit 0,25 mM Ascorbinsäure und in normalem Medium kultivierte Zellen analysiert. Für Immunfluoreszenzanalysen und Färbungen wurden die Zellen auf speziellen Glas-Objektträgern mit Kammern (glass chamber slides, NUNC) kultiviert.

3.2.4 Calciumbestimmung

Für die Calciumbestimmung von Zellkulturmedium, Perizellulärmatrix und Zellen von postkonfluenten Osteosarkomzell-Linien (s. 3.2.3) wurden die Kulturen wie folgt aufgearbeitet: Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen pro 10 cm Platte mit 1 ml 0,5% Triton X-100 in 0,5 M HCl überschichtet und Zellen und Matrix mit Hilfe eines Gummischabers in ein Eppendorfgefäß transferiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand (Matrix) in eine neues Eppendorfgefäß transferiert. Vor der Calciummessung wurde der pH-Wert der Überstände mit 0,05-fachem Volumen 5 M NaOH und 0,1-fachem Volumen 3 M Tris-HCl, pH 8,8, auf 7,2 eingestellt. Die Zellreste wurden in 250 µl H₂O resuspendiert und ebenso wie die Kulturmedien direkt vermessen.

Die Calciumbestimmung erfolgte mit einem kolorimetrischen Nachweis (Sigma), der auf Bildung eines roten Calcium-Arsenazo-III-Komplexes beruht. Die Messungen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei jeweils 50 µl Proben, Standard (CaCl₂-Lösungen) oder Lösungsmittel eingesetzt wurden. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.5 Phosphatbestimmung

Die Probenvorbereitung für die Phosphatbestimmung von Zellkulturmedium, Perizellulärmatrix und Zellen von postkonfluenten Osteosarkomzell-Linien erfolgte, wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben. Für die Phosphatbestimmung mussten die Überstände nicht neutralisiert werden.

Die Phosphatbestimmung erfolgte durch Bildung eines blauen Phosphomolybdänkomplexes, welcher fotometrisch vermessen werden konnte (Sigma). Als Standards wurden anorganische Phosphate eingesetzt. Die Messungen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei pro Ansatz 50 µl Proben, Standard oder Lösungsmittel eingesetzt wurden. Das Reaktionsvolumen wurde auf 1/5 der angegebenen Mengen reduziert. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.6 Darstellung von in Zellkultur gebildetem Hydroxylapatit

Die Färbung nach von Kossa (1901) ist eigentlich eine histologische Färbetechnik zur Untersuchung des Knochengewebes, bei der Calcium in den Carbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht wird, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden und braunschwarz erscheinen. Diese Färbetechnik (Romeis, B., 1989) wurde hier auf Zell-Linien, die auf speziellen Glas-Objektträgern mit Kammern (glass chamber slides, NUNC) kultiviert wurden, übertragen, um gebildetes Hydroxylapatit anzufärben.

Zuerst wurden die Zellen dreimal mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, für 15 min mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernung der Kammern wurden die Objektträger für 5 min gewässert und für 30 min in Färbelösung (5% AgNO₃ in H₂O) unter Ausschluss von Licht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 min in Reduktionslösung (5% Na₂CO₃, 3,7% Formaldehyd), für 2 min in Fixierlösung (5% Na-Thiosulfat) und für 3 min eine Kernfärbung mit Kernechtrot (0,1% Kernechtrot in 5% Aluminiumsulfatlösung, filtriert). Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger gewässert. Abschließend wurden die Zellen mit einem Tropfen Elvanol überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Elvanol wird hergestellt, indem man 12 g Moviol (Hoechst), 30 ml H₂O, 60 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, und 30 g Glycerin in Lösung bringt, 15 min bei 5000 g abzentrifugiert und den klaren Überstand mit 2 g 1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octan (Sigma) versetzt. Elvanol wurde bei -20°C gelagert.

3.2.7 Zelladhäsionsassay

Zur Überprüfung der Adhäsion von verschiedenen humanen Mammakarzinomzell-Linien an rekombinantes BSP wurde das Protein in Mengen von 0 bis 5 µg (100 µl/Loch) über Nacht bei 4°C an die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockierung der noch freien Plastikbindungsstellen für 30 min bei 37°C mit 1% BSA in H₂O (100 µl/Loch) und Entfernung der Blockierungslösung wurden 5x10⁴ mittels Trypsin/EDTA-Behandlung (s. 3.2.1) abgelöste Zellen (Passage 3-5) in 100 µl serumfreiem Kulturmedium pro Loch hinzugegeben. Die Adhäsion der Zellen erfolgte für eine Stunde im Zellkulturbrutschrank (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden nicht adhärierte Zellen vorsichtig abgegossen, die Platte mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und adhärierte Zellen für 10 min mit 1% Glutaraldehyd in PBS (100 µl/Loch) fixiert. Die Anfärbung der Zellen erfolgte für 25 min in 0,1% Kristallviolett in H₂O. Nicht in die

Zellen eingelagerte Färbelösung wurde mit H₂O entfernt und die Zellen durch Zugabe von jeweils 50 µl 0,2% Triton X-100 lysiert. Die Absorption des dadurch freigesetzten Farbstoffes wurde fotometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 570 nm gemessen.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Allgemeine Methoden

3.3.1.1 Fällung von Proteinen

Bei der Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure wurde die Proteinlösung mit 0,25-fachem Volumen 50% Trichloressigsäure in H₂O (w/v) und mit 0,01-fachem Volumen 10 % Triton X-100 für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine für 15 min bei 20000 g und 4°C abzentrifugiert, mit eiskaltem Aceton gewaschen, nochmals abzentrifugiert und das getrocknete Pellet in Puffer resuspendiert.

Bei der Fällung von Proteinen mit Ethanol wurde die Proteinlösung auf eine Salzkonzentration von mindestens 0,15 M NaCl gebracht, mit neun-fachem Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend für eine Stunde bei 5000 g und 4°C abzentrifugiert, getrocknet und in Puffer resuspendiert.

3.3.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) in einer SE 250 Mighty Small II Elektrophoresekammer (Hoefer, Pharmacia) durchgeführt. Die 10%igen Trenngele und 4%igen Sammelgele setzten sich aus den in Tabelle 4 aufgelisteten Komponenten zusammen. Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% β-Mercaptoethanol) für 5 min bei 100°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Elektrophoresepuffer (20 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) für ca. eine Stunde bei konstant 160 Volt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der LMW-Marker von Pharmacia mit aufgetrennt.

	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	13%	33%
0,5 M Tris-HCl, pH6,8	25%	/
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	/	25%
10% SDS in H ₂ O	1%	1%
H ₂ O	60%	40%
10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O	1%	1%
Temed	0,05%	0,05%

Tab. 4: Komponenten der verwendeten Sammelgele und Trenngele.

Angaben in Volumenprozent.

3.3.1.3 Coomassiefärbung

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für 1-2 Stunden in Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt und mit Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) gewaschen, bis der Hintergrund klar war und die Proteine als blaue Banden sichtbar wurden. Die so gefärbten Proteingele wurden fotografisch dokumentiert und anschließend getrocknet oder in 7% Essigsäure gelagert.

3.3.1.4 Silberfärbung

Zunächst wurden die SDS-Gele zweimal für 10 min in 30% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert, worauf eine 15-minütige Inkubation in 30% Ethanol, 10% 4 M Na Acetat, 0,3% Essigsäure, 2% Glutaraldehyd (25%ig), 0,1% Na₂ S₂O₃ x 5H₂O folgte. Anschließend wurden die Gele fünfmal für 5-10 min in H₂O geschwenkt, 15 min in 0,1% AgNO₃, 0,025% Formaldehyd-Lösung inkubiert und dann für 30 s und nochmal bis zur Entwicklung des Bandenmusters in 2,5% Na₂CO₃, 0,04% Formaldehyd-Lösung geschwenkt. Die Reduktion wurde mit 7% Essigsäurelösung gestoppt. So gefärbte Proteingele wurden fotografisch dokumentiert und anschließend getrocknet oder in 7% Essigsäure gelagert.

3.3.1.5 Färbung mit Stains All

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese für ca. zwei Stunden in 25% Isopropanol fixiert, wobei die Lösung alle 10 min gewechselt und das Gel dabei mehrmals mit frischer Lösung abgespült wurde. Anschließend wurde das Gel über Nacht unter Ausschluss von Licht in Färbelösung (0,025% Stains All, 25% Isopropanol, 7,5% Formamid, 30 mM Tris-HCl, pH 8,8) inkubiert und dann in H₂O transferiert. Da der Farbstoff lichtsensitiv ist, erfolgte die Entfärbung des Hintergrunds auf einem Leuchttisch, wonach die fotografische Dokumentation stattfand.

3.3.1.6 Quantifizierung von Proteinen

3.3.1.6.1 BCA

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA-Kits (PIERCE), der auf der Biuret Reaktion basiert, bei der Proteine mit Cu²⁺ Ionen und dem Natriumsalz der Bichinonsäure in alkalischer Lösung violett gefärbte Komplexverbindungen bilden, die fotometrisch anhand von Standardproteinen quantifiziert werden können. Die Assays wurden in Anlehnung an die Vorschriften des Herstellers wie folgt durchgeführt: In die Löcher einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 µl Proteinprobe, Standard (BSA bis zu 1 mg/ml) oder Lösungsmittel gegeben. Hinzugefügt wurden 200 µl BCA-Reagenz, wonach die Platte für 30 min bei 60°C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die fotometrische Messung bei 562 nm in einem ELISA-Reader.

3.3.1.6.2 UV-Spektroskopie

Bei der Proteinbestimmung durch UV-Spektroskopie macht man sich die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten von Proteinen zu Nutze. Zur Konzentrationsbestimmung wurden UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 350 nm aufgenommen. Aus der Differenz der Absorptionen bei 280 nm und 320 nm wurde mit Kenntnis des theoretischen Molekulargewichts von BSP (33628,5 Da) und des molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{280} = 29440 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Gill et al., 1989) die BSP-Konzentration nach dem Lambert Beerschen Gesetz berechnet.

3.3.1.7 Aufkonzentrierung von Proteinen

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurden die im Folgenden aufgeführten Methoden angewendet:

Nach Dialyse gegen 0,1 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,0, wurde die Proteinlösung entweder eingefroren und lyophilisiert oder in einer Speed Vac eingeeengt.

Centricon-50-Röhrchen (amicon) wurden mit 2 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, gewaschen, wonach die Proteine in die obere Kammer gegeben wurde. Durch Zentrifugation bei 6500 rpm wurde die Proteinlösung auf das gewünschte Volumen eingeeengt.

Eine 1 ml Anionenaustauschersäule mit einer Matrix aus quervernetzter Agarose, die quarternäre Amine trägt (Hi-Trap-Q, Pharmacia) wurde mit 5 ml Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0), 5 ml Puffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 M NaCl) und 5 ml Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Matrix gepumpt. Nach Waschen der Säule mit 5 ml Puffer A wurde das Protein mit 20 ml Puffer B eluiert, wobei 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die BSP-haltigen Fraktionen wurden mittels Immunoblot (s. 3.4.2) identifiziert.

3.3.1.8 N-terminale Ansequenzierung

Die N-terminale Sequenz von rekombinantem BSP wurde mittels Edman Ansequenzierung vom Servicelabor des Zentrums für molekulare Medizin Köln auf einem Applied Biosystems 473A Proteinsequenziergerät ermittelt. Dazu wurden 300 pmol BSP (ohne Fusionspeptid-elemente) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, eingesetzt.

3.3.2 Chromatografische Verfahren

Mit Ausnahme der FPLC-Auftrennungen wurden alle Chromatografien bei 4°C durchgeführt. Alle Lösungen wurden durch Filtrierung (0,22 µm Filter) von Partikeln befreit und gleichzeitig entgast.

3.3.2.1 Anionenaustauscherchromatografie zur Aufreinigung von BSP aus humanen Knochen

Die Hälfte der aus 300 g Knochenmehl erhaltenen Extrakte (s. 3.3.5) wurden nach Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, von Brigitte Kaufmann auf einer 90 ml DEAE-Sepharose-Fast-Flow-Säule (Pharmacia) aufgetrennt. Hierbei handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher, dessen Matrix aus Agarose mit Diethylaminoethylgruppen besteht, welche im pH-Bereich von 2 bis 12 positiv geladen sind. Die zwischen 0,35 M und 0,85 M NaCl eluierten BSP-haltigen Fraktionen wurden gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, dialysiert und auf einer 20 ml DEAE-Sepharose-Fast-Flow-Säule (Pharmacia) aufkonzentriert. Zur Unterdrückung von Protease-Aktivitäten wurden alle Puffer mit folgenden Proteaseinhibitoren versetzt: 0,5 mM PMSF, 2 mM EDTA, 1 mM Benzamidin-HCl, 1 mM 6-Aminocaprinsäure. Die Puffer für die Anionenaustauschersäulen bestanden aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, (Puffer A) und 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 M NaCl (Puffer B).

Zur Aufkonzentrierung wurde das dialysierte Protein auf die mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Säule gegeben, wobei die Flussgeschwindigkeit bei 2 ml/min lag. Nach Waschen der Säule mit 40 ml Puffer A wurde das BSP mit 40 ml Puffer B eluiert und in 20 Fraktionen von 2 ml gesammelt. Die mittels Immunoblot analysierten BSP-positiven Fraktionen wurden gemeinsam gegen 50 mM Tris, pH 8,5, dialysiert und über eine ResourceQ-Säule weiter aufgereinigt.

Bei der ResourceQ-Säule (Pharmacia) handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, dessen Matrix aus Polystyren/Divinylbenzol-Kugeln mit quartären Aminen als Ladungsträgern besteht. Die 1 ml Säule wurde an ein FPLC-System von Pharmacia angeschlossen und eine Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gewählt. Nach Äquilibrierung der Säule mit Puffer A und Beladung mit den dialysierten Proteinen wurde die Säule mit 10 ml 85% Puffer A und 15% Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 15%-100% Puffer B über einen Zeitraum von 20 min, wonach der Gradient für 5 min bei 100% Puffer B gehalten wurde. Da die gesammelten Fraktionen auch nach wiederholten ResourceQ-Aufreinigungsschritten neben der BSP-Bande Verunreinigungen bei Coomassie gefärbten Gelen aufwiesen, erfolgte die weitere Aufreinigung des Materials über Affinitätschromatografie mit dem monoklonalen BSP-Antikörper (s. 3.4.1). Parallel dazu wurde ein Teil der Fraktionen mittels "Reversed-Phase"-HPLC-Chromatografie von Markus Karmatschek (Immundiagnostik) bis zur Homogenität aufgereinigt.

3.3.2.2 Affinitätschromatografie

3.3.2.2.1 Nickel-NTA-Matrix

Zur Aufreinigung von his₆-myc-BSP aus serumfreien Zellkulturüberständen transfizierter Zellen mittels Metallaffinitätschromatografie wurde eine Ni-NTA Superflow Matrix (QIAGEN) verwendet. Die an die Matrix gekoppelte Nitrilotriessigsäure (NTA) bindet Nickel-Ionen als vierzähliger Chelator, wodurch noch zwei der insgesamt sechs koordinativen Bindungsstellen des Nickel-Ions mit den Histidinen des Fusionsproteins reagieren können. Der serumfreie Zellkulturüberstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen, und der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt. Nach Spülen der 20 ml Säule mit Äquilibrationpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,3 M NaCl) wurde der Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Nickelmatrix gepumpt. Anschließend wurde die Säule zuerst mit 100 ml Äquilibrationpuffer und dann mit 100 ml Äquilibrationpuffer, dem 35 mM N'-Octyl-β-D-Glukopyranosid (GERBU) zugesetzt wurde, gewaschen. Das his₆-myc-BSP wurde danach stufenweise mit dreimal 60 ml Äquilibrationpuffer, der ansteigende Mengen von Imidazol enthielt (10 mM, 20 mM, 0,25 M), eluiert. Die im Silbergel sauberen BSP-Fractionen wurden zusammengegeben, gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert und bei -20°C gelagert.

3.3.2.2.2 Glutathion-Matrix

Zur Aufreinigung des rekombinanten GST-BSPs aus serumfreien Zellkulturüberständen wurde Sepharose 4B, an die Glutathion (Substrat der Glutathion S-Transferase) gekoppelt ist (Pharmacia), verwendet. Eine 5 ml Säule wurde zunächst mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) äquilibriert und danach mit filtriertem Zellkulturüberstand bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Nach Waschen der Säule mit 60 ml PBS wurden 10 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) über die Matrix gegeben, die Säule für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 40 ml Elutionspuffer und 20 ml Elutionspuffer, der 0,5 M NaCl enthielt, eluiert. Die BSP-positiven Fractionen wurden bei -20°C gelagert.

3.3.2.2.3 Hydroxylapatit-Matrix

Für die Analyse der Bindungsaffinität von BSP an Hydroxylapatit wurde eine 1 ml Econo-Pac CHT-II Hydroxylapatitsäule (BIO RAD) zusammen mit einem FPLC-System von Pharmacia verwendet. Die Puffer hatten folgende Zusammensetzung: 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2, (Puffer A), 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2, (Puffer B). Das aus Knochen isolierte BSP und das rekombinante BSP aus EBNA-293 Zellen wurde in Puffer A gelöst, das rekombinante BSP aus der Mammakarzinomzell-Linie MCF-7 wurde in Form von serumfreiem Zellkulturüberstand auf die Säule gegeben. Nach Äquilibration mit 10 ml Puffer A wurden jeweils 50 µg BSP mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 5 ml Puffer A gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0% Puffer B bis 100% Puffer B über einen Zeitraum von 20 min eluiert. Die Nachelution erfolgte mit 5 ml Puffer B. Jeweils 20 µl der 0,5 ml Fraktionen wurden mittels Immunoblot (s. 3.4.2) auf ihren BSP-Gehalt untersucht. Der Bereich der BSP-positiven Fraktionen wurde in Korrelation zur Menge des für die Elution benötigten Natriumphosphatpuffers gesetzt und so die Hydroxylapatit-Affinität der BSPs verschiedenener Herkunft miteinander verglichen.

3.3.3 Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität in BSP-Fusionsproteinen

Mit Hilfe des GST-Detektionsmoduls von Pharmacia wurde die Glutathion-S-Transferase Aktivität in BSP-Fusionsproteinen bestimmt. Dabei handelt es sich um einen spektroskopischen Nachweis, bei dem vorhandene Glutathion-S-Transferase die Reaktion von CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen) mit Glutathion zu einem Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 340 nm katalysiert, was fotometrisch verfolgt werden kann. Pro Ansatz wurden 100 µl 1 M Kaliumphosphat, pH 6,5, 10 µl 0,1 M CDNB in Ethanol, 10 µl 0,1 M reduziertes Glutathion in H₂O und 880 µl H₂O zusammengegeben und auf zwei 500 µl Küvetten verteilt. Zur Messküvette wurden 50 µl GST-BSP-Fusionsprotein in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, gegeben, zur Nullwertküvette wurden 50 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, gegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 340 nm über einen Zeitraum von jeweils 2 min, wobei die Absorptionsänderung pro Minute ein Maß für die GST-Aktivität darstellt.

3.3.4 Abspaltung und Entfernung der Fusionspeptide

Zur Entfernung der his₆-myc- und GST-Sequenzen der BSP-Fusionsproteine wurden, je nach Konstrukt (s. 4.1.1), die Proteasen Enterokinase oder Faktor X (Boehringer) eingesetzt.

Für den Verdau wurden die in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, gelösten Proteine in einem 20-200 fachen Überschuss im Gewichtsverhältnis zum jeweiligen Enzym eingesetzt und für 24-48 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die erfolgreiche Abtrennung der Fusionspeptide wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot überprüft (s. 4.1.4).

Um das abgeschnittene his₆-myc-Peptid aus der BSP-Lösung zu entfernen, wurde der Protease Verdau auf eine mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, äquilibrierte 5 ml Ni-NTA-Säule (s. 3.3.2.2.1) gegeben. Während das his₆-myc-Peptid an die die Nickel-Ionen der Säule gebunden hat, befand sich das BSP im Durchfluss. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 20 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, gespült und die gesammelten 2 ml Fraktionen im Immunoblot auf ihren BSP-Gehalt untersucht.

Die Entfernung der Enterokinase aus der BSP-Lösung erfolgte mit Hilfe des Enterokinase-Away-Resins von Invitrogen. Dabei handelt es sich um eine Agarosematrix, an die der Trypsin-Inhibitor der Sojabohne gekoppelt ist, welcher eine sehr hohe Affinität für die Enterokinase besitzt. Diese Matrix wurde im 15 ml Falcon-Gefäß 2 Mal mit jeweils vier-fachem Volumen Puffer A (0,1 M NaCl, 0,1 M Ameisensäure, pH 3,0) und Puffer B (0,5 M NaCl, 50 mM Kaliumphosphat, pH 8,0) äquilibriert und als 50% ige Suspension in Puffer B eingesetzt. Die Proteinlösung wurde mit zehn-fachem Puffer B auf den pH-Wert und die Salzbedingungen der Matrix eingestellt. Pro Unit Enterokinase in der Proteinlösung wurden 30 µl der Matrixsuspension hinzugegeben und die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Matrix mit der gebundenen Enterokinase für 5 min bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand (BSP in 0,5 M NaCl, 50 mM KPO₄) in ein neues Gefäß transferiert.

Um die Salze aus der Proteinlösung zu entfernen, wurden 2,5 ml auf eine mit 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, äquilibrierte PD10-Säule (Pharmacia) gegeben, wobei es sich um eine mit 9,1 ml Sephadex G-25 gepackte Säule handelt. Das BSP wurde in 3,5 ml 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.5 Extraktion von BSP aus humanem Knochenmehl

Das humane Knochenmehl stammt von Patienten mit Hüftoperationen (Oberschenkelköpfe) und wurde von der Firma Immundiagnostik zur Verfügung gestellt. Die Extraktion wurde im Rahmen der Aufreinigung von BM-40 von Brigitte Kaufmann durchgeführt. Dabei wurden 300 g humanes Knochenmehl zwei Tage in einem Liter 4 M Gu-HCl in 50 mM Tris-HCl,

pH 7,5, von Blutresten gereinigt und anschließend zweimal für 24 Stunden mit 1,5 l 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen, um das denaturierend wirkende Gu-HCl zu entfernen. Um nicht-collagenartige Proteine freizusetzen, wurde der Rückstand dreimal für 2-3 Tage mit jeweils 1,5 l 0,5M EDTA, pH 7,5, extrahiert. Von jedem Extraktionsschritt wurden 2 ml gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, dialysiert, TCA gefällt und im Immunoblot (s. 3.4.2) analysiert. BSP war in allen drei EDTA-Extrakten vorhanden, wobei das Signal im ersten EDTA-Extrakt am stärksten war. Die Aufreinigung des BSPs aus den Knochenextrakten erfolgte, wie unter Punkt 3.3.2.1 beschrieben.

3.3.6 Extraktion von BSP aus Hydroxlyapatitkristallen

Unter Supplementierung von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure gewachsene und in normalem Medium postkonfluent kultivierte Osteosarkomzell-Linien (s. 3.2.3) wurden nach 7, 14 und 21 Tagen pro 10 cm Kulturschale in Anlehnung an Kasugai et al. (1992) wie folgt extrahiert: Nach Entfernung des Kulturmediums erfolgte die Zugabe von 1 ml eiskalter 0,5 M Ammoniaklösung für 40 s. Zellen und Matrix wurden in der Ammoniaklösung mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Nach Abzentrifugation der Zellreste wurde der Überstand für jeweils 24 Stunden mit zweimal 1 ml 4 M Gu-HCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, danach mit zweimal 1 ml 0,5 M EDTA in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, und anschließend zweimal mit 1 ml 4 M Gu-HCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, extrahiert. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten wurde jeweils dreimal mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) gewaschen. Alle Lösungen enthielten folgende Protease-Inhibitoren: 0,1 M 6-Aminocaprinsäure, 5 mM Benzamidin-HCl, 1 mM PMSF. Die Extrakte wurden gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, dialysiert, TCA gefällt und mittels Immunoblot (s. 3.4.2) auf ihren BSP-Gehalt untersucht.

3.3.7 Behandlung von BSP mit Protein Phosphatase 1

In einem 50 μl Reaktionsansatz wurden 2 μg rekombinantes BSP in 0,5 mM MnCl_2 und 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit 1,2 mU Protein Phosphatase 1 (Calbiochem) über Nacht bei 37°C verdaut und mittels Immunoblot (s. 3.4.2) im Vergleich zu unverdaulichem BSP analysiert.

3.3.8 Calcium abhängiger α -Chymotrypsin Verdau von BSP

Um den Einfluss von Calcium auf die Proteolyse von rekombinantem BSP zu untersuchen, wurde das Protein mit der Calcium unabhängig spaltenden Protease α -Chymotrypsin in Gegenwart von 0 mM, 2 mM und 20 mM CaCl_2 verdaut und die Spaltprodukte mittels Immunoblot (s. 3.4.2) analysiert. Dazu wurden pro Reaktionsansatz 0,2 μg rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, und 0,1 M NaCl mit 0,15 mU α -Chymotrypsin (Serva) in Gegenwart der verschiedenen CaCl_2 -Mengen für 5 min, 10 min, 20 min, und 60 min bei 37°C verdaut. Bei der Negativkontrolle wurde das Enzym durch H_2O ersetzt. Die Reaktionen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten durch Zugabe von SDS-PAGE Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% β -Mercaptoethanol) und Inkubation für 5 min bei 100°C gestoppt.

3.3.9 Circular dichroismus-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde die Faltung von BSP untersucht und der Einfluss von Calcium auf die Sekundärstruktur analysiert. Dazu wurden Proteine bekannter Konzentration (0,1-0,2 mg/ml) in einem JASCO J715 Spektropolarimeter bei 25°C in einer thermostatisierten Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke (Hellma) analysiert. Der Wellenlängenbereich lag zwischen 190 nm und 250 nm und die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min aufgezeichnet. Die Response Zeit lag bei 4 s, das Datenintervall betrug 0,1 nm und es wurden jeweils fünf Spektren akkumuliert und gemittelt. Bei der Auswertung der CD-Spektren wurde zuerst das Pufferspektrum abgezogen, dann wurde die Nulllinie ausgeglichen, die Spektren um den Wert der Volumenänderung nach Zugabe von CaCl_2 oder EDTA korrigiert, die Messwerte in die spezifische Elliptizität umgerechnet und die Kurven geglättet. Die spezifische Elliptizität $[\Theta]$ hat die Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}]$ und wurde folgendermaßen berechnet: $[\Theta] = \Theta \times \text{MW}_{\text{aa}} / (c \times d)$, wobei Θ = gemessene Elliptizität [mdeg], MW_{aa} = mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure [110g/mol], c = Proteinkonzentration [mg/ml], d = Schichtdicke der Küvette [mm] ist. Nach Zugabe von CaCl_2 oder EDTA wurde der Küvetteninhalt durch mehrmaliges Invertieren gleichmäßig durchmischt und 5 min zur Einstellung des neuen Gleichgewichts im Küvettenhalter inkubiert.

3.3.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Rotationsbedampfung, Negativkontrastierung)

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen wurden von Patric Nitsche durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Techniken angewendet: Bei der Negativkontrastierung (Engel et al., 1981) wurde das Protein (2 µg/ml) an ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfernetz, das zuvor in einer Glimmentladung bei niedrigem Druck hydrophil gemacht wurde, adsorbiert. Nach Waschen mit H₂O wurde mit 0,75 %igem Uranylformiat gefärbt. Eine amorphe Schicht aus Uranylsalz lagert sich nur dort ab, wo kein Protein adsorbiert ist. Im Elektronenmikroskop geht der Elektronenstrahl nur durch die Proteine hindurch, weshalb diese auf dem Negativ als schwarze und auf dem Positiv-Bild als weiße Strukturen zu erkennen sind. Bei der Rotationsbedampfung (Engel et al., 1987) wurde das Protein (20 µg/ml) im Verhältnis 1:1 mit 80% Glycerin verdünnt und auf einen frisch gespaltenen Glimmer gesprüht. Unter einem Winkel von 6-8° wurde danach ein Platin/Kohlenstoff Partikelstrom auf die rotierende Probe geleitet. Die Umhüllung des Proteins mit dem Schwermetall führt im Elektronenmikroskop zu einer Streuung der Elektronenstrahlen, wodurch die Proteine im Negativ weiß und im Positiv-Bild schwarz erscheinen. Im Vergleich zur Negativkontrastierung reduziert die Umhüllung des Proteins mit Glycerin und Platin bei der Rotationsbedampfung die Auflösung. Andererseits werden fibrilläre Strukturen, die bei der Negativkontrastierung oft schwer zu erkennen sind, besser sichtbar gemacht. Deshalb wurden beide Techniken parallel angewendet.

3.3.11 Fibrillogenese von Collagen I

Die Bildung von Collagen I Fibrillen wurde durch Trübungsmessungen bei 350 nm im Fotometer verfolgt. Dazu wurden folgende auf 4°C vorgekühlte Lösungen in eine auf 37°C temperierte Küvette gegeben und gemischt: 919 µl HEPES-Puffer, pH 7,4, 14 µl 0,1 N NaOH, 0,5 µl 30% HCl, 167 µl Collagen I (3 mg/ml, pepsinextrahiert aus Rinderhaut, CELLON). Unmittelbar nach Zugabe des Collagens wurde die durch den pH-Anstieg von pH 2 nach pH 7,4 und durch die Temperaturerhöhung verursachte Fibrillenbildung im Fotometer über einen Zeitraum von 30 min gemessen.

3.3.12 Cyanogenbromidspaltung von Collagenen

Die Cyanogenbromidspaltung von Collagen I und II wurde von Robert Dinser durchgeführt. Dabei wurde lyophilisiertes Collagen in 150 µl 70% Ameisensäure aufgenommen und für 30 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 50 µl CNBr-Lösung (10 mg CNBr in 50 µl 70 % Ameisensäure) versetzt, durch 2 minütige Einleitung von N₂ entoxygenisiert und über Nacht bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht rotiert. Nach Zugabe von 1,8 ml H₂O wurden die Proben eingefroren und lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden direkt in reduzierendem SDS-Probenpuffer (s. 3.3.1.2) aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (s. 3.4.2). Die Membran wurde vor Entwicklung mit dem BSP-Antikörper für 1,5 Stunden mit 100 µg rekombinantem his₆-myc-BSP in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) inkubiert, um die Bindung des Proteins an die Collagenfragmente zu untersuchen.

3.4 Immunchemie

3.4.1 Affinitätsreinigung von BSP

Das aus humanen Knochen extrahierte (s. 3.3.5) und mittels Anionenaustauscherchromatografie (s. 3.3.2.1) gereinigte BSP wurde in einem letzten Aufreinigungsschritt mit Hilfe des monoklonalen BSP-Antikörpers (Immundiagnostik) affinitätsgereinigt. Dazu wurden zuerst 0,4 mg Antikörper gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,3, 0,5 M NaCl) dialysiert, auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und die O. D. bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung im Fotometer gemessen. Als Matrix wurden 60 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) eingesetzt, die durch 10 min Inkubation in 1 ml 1 M HCl auf ca. 200 µl Matrix aufgequollen wurde. Zur Aktivierung der Sepharose wurde diese in einem Eppendorfgefäß zehnmal für 2 min in 1 ml 1 M HCl gewaschen. Um den Antikörper an die Säule zu koppeln, wurde dieser mit der aktivierten Matrix über Nacht bei 4°C in Kopplungspuffer rotierend inkubiert. Das Verhältnis lag somit bei 2 mg Antikörper pro 1 ml gequollener Säulenmatrix. Anschließend wurde nach Zentrifugation (1000 rpm, 2 min) der Matrix die O. D. ₂₈₀ des Überstands fotometrisch bestimmt. Die Kopplungskonstante, die sich aus dem Verhältnis der optischen Dichten der Antikörperlösungen vor und nach Kopplung an die CNBr-Sepharose berechnet, wies auf 98% ige Bindung hin. Zur Absättigung noch freier Bindungsstellen wurde die Affinitätsmatrix über Nacht bei 4°C in 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0, rotierend inkubiert, wonach sie ca. fünfmal abwechselnd mit jeweils 1 ml Puffer A (0,1 M Na Acetat, pH 4,0, 0,5 M NaCl) und Puffer B (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl) gewaschen und in TBS

(50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) äquilibriert wurde. Die aufzureinigende Proteinlösung wurde nach Dialyse gegen TBS, pH 7,4, mit der Affinitätsmatrix über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Matrix zur Entfernung unspezifischer Proteine abwechselnd fünfmal mit jeweils 5 ml TBS, pH 7,4, und 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte viermal alternierend mit jeweils 0,5 ml 0,1 M Glycin, pH 2,5, und 0,1 M Triethylamin, pH 11,5, wobei nach jedem Schritt mit 0,5 ml TBS, pH 7,4, gewaschen wurde. Die sauren Eluate wurden sofort mit 0,1-fachem Volumen 1 M Tris-HCl, pH 8,0, neutralisiert, die basischen Eluate mit 0,1-fachem Volumen 1 M Tris-HCl, pH 6,8. Die Fraktionen wurden mittels Immunoblot (s. 3.4.2) auf ihren BSP-Gehalt untersucht. Alle Lösungen, die zur Affinitätsreinigung des BSPs verwendet wurden, waren mit Protease-Inhibitoren (0,5 mM PMSF, 2 mM EDTA, 1 mM Benzamidin-HCl, 1 mM 6-Aminocapronsäure) versetzt und wurden durch Filtrierung (0,22 µm Filter) von Partikeln befreit.

3.4.2 Immunoblot

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 3.3.1.2) wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch aus den Gelen auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA45, Schleicher und Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 4°C in einer Blotkammer (Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer Pharmacia) in Boratpuffer (50 mM Natriumborat, pH 8,5, 10% Methanol) für eine Stunde bei ca. 1-2 mA/cm² oder über Nacht bei ca. 0,5 mA/cm². Anschließend wurde die Membran 5 min in 10% Ponceau S-Lösung (Serva) gefärbt und die Positionen der Markerbanden mit Bleistift markiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch 60 min Inkubation in 5% Milchpulver in TBS, pH 7,4, (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) wurden Primär- und Sekundärantikörper verdünnt in 5% Milchpulver in TBS, pH 7,4, für jeweils 60 bis 90 min auf die Membran gegeben. Primärantikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt, Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper in einer 1:2000 Verdünnung. Nach jedem Antikörper-Inkubationsschritt wurde die Membran dreimal für 10-15 min in TBS, pH 7,4, 0,01% Tween 20 gewaschen. Zur Chemolumineszenz-Detektion der Proteine wurde die Membran für 10 min mehrmals in H₂O gespült, für 1 min in einer Mischung aus frisch angesetzter Lösung A (22 µl 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO, 50 µl 0,25 M Luminol in DMSO, 5 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5) und Lösung B (3 µl 30% H₂O₂, 5 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5) geschwenkt und mit einem Röntgenfilm für jeweils 15 s, 1 min und 15 min bedeckt. Die für Immunoblots verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Antikörper	Herkunft
Maus anti humanes BSP m AK	Immundiagnostik
Kaninchen anti humanes BSP (Lot 970909, Lot 9906-157)	Immundiagnostik
LF-6 (Kaninchen anti humanes BSP)	L. Fisher
LF-83 (Kaninchen anti C-terminales humanes BSP-Peptid)	L. Fisher
Maus anti c-myc (9E10) m AK	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti Phosphotyrosin (PY20) m AK	Transduction Laboratories
Kaninchen anti Maus-Peroxidase konjugiert	DAKO
Schwein anti Kaninchen-Peroxidase konjugiert	DAKO

Tab. 5: Für Immunoblots verwendete Antikörper.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die auf speziellen Glas-Objektträgern mit Kammern (glass chamber slides, NUNC) kultivierten Zellen wurden dreimal 5 min mit PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und mit 2% Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Zellen, die permeabilisiert werden sollten, wurden daraufhin für 2 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Plastikbindungsstellen für eine Stunde mit 1% Ziegenserum in PBS überschichtet. Primärantikörper und Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Sekundärantikörper wurden, in 1% Ziegenserum/PBS verdünnt, für jeweils eine Stunde auf die Zellen gegeben, wobei alle Inkubationen ab dem zweiten Antikörper unter Ausschluss von Licht erfolgten. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit einem Tropfen Elvanol (s. 3.2.6) überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgewertet und fotografiert. Als Negativkontrollen wurden nur mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen dokumentiert. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden Zellen in einem Teil der Kammern nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 15 min bei 37°C in Bisbenzimidlösung (Bisbenzimid (Hoechst 33258) 1 mg/ml in Methanol 1: 1000 in PBS verdünnt) inkubiert. Die für Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper sind mit den eingesetzten Verdünnungen in Tabelle 6 aufgelistet.

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Maus anti humanes BSP m AK	1:1000	Immundiagnostik
Maus anti Collagen I m AK	1:200	Sigma
Kaninchen anti Fibronectin	1:500	M. Paulsson
Cy3 konjugierter Ziege anti Maus	1:800	Jackson ImmunoResearch
Cy2 konjugierter Ziege anti Kaninchen	1:200	Jackson ImmunoResearch

Tab. 6: Für Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzte Antikörper.

3.4.4 FACS

Zellen wurden mit 1% EDTA von der Kulturschale abgelöst und zweimal mit Waschlösung (0,5% BSA, 10 mM EDTA in PBS (0,14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4)) gewaschen. Danach wurden jeweils 10⁶ Zellen in 100 µl Waschlösung zuerst mit dem Primärantikörper und danach mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper für jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ab dem zweiten Antikörper wurden alle Inkubationen unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen pro Ansatz mit 10 ml Waschlösung gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 500 µl Waschlösung resuspendiert, die FACS-Messung in einem FACSCalibur Gerät von Becton Dickinson durchgeführt und die Resultate mit dem cell quest Programm ausgewertet. Als Negativkontrollen wurden sowohl ungefärbte Zellen als auch nur mit dem Zweitantikörper inkubierte Zellen gemessen. Die eingesetzten Antikörper sind mit den dazugehörigen Verdünnungen in Tabelle 7 aufgelistet:

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Maus anti humanes BSP m AK	1:50	Immundiagnostik
LF-83 (Kaninchen anti C-terminales humanes BSP-Peptid)	1:50	L. Fisher
FITC-konjugierter Ziege anti Maus	1:20	DAKO
DTAF-konjugierter Ziege anti Kaninchen	1:10	Jackson ImmunoResearch

Tab. 7: Für FACS-Messungen verwendete Antikörper

3.4.5 BSP-ELISA

Mit Hilfe des BSP-ELISAs wurden die BSP-Konzentrationen von Proteinlösungen anhand einer mit rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen erstellten Eichkurve ermittelt. Dazu wurden die Proteine über Nacht bei 4°C an die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Als Nullwert wurden die jeweiligen Lösungsmittel ohne Proteine an die Platte gebunden. Nach Blockierung noch freier Plastikbindungsstellen mit 5% Milchpulver in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) (200 µl pro Loch) wurde der erste Antikörper (monoklonaler BSP-Antikörper, Immundiagnostik) für 45 min in einer Verdünnung von 1:8000 in Blockierungslösung hinzugegeben. Danach erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Kaninchen anti Maus-Peroxidase konjugiert, DAKO) in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungslösung. Alle Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in einem Volumen von 100 µl pro Loch. Nach jedem Schritt wurde fünfmal mit jeweils 200 µl TBS, 0,01% Tween 20 gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 100 µl TMB-Färbelösung (0,1 M Natriumacetat/Zitronensäure-Puffer, pH 6,0, 62,5 µg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 0,0026% H₂O₂) pro Loch. Abgebrochen wurde die Reaktion nach ausreichender Blaufärbung durch Hinzugabe von 50 µl 20% H₂SO₄. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

3.4.6 Collagen I-BSP-Bindungstest

Die potenzielle Interaktion von Collagen I mit rekombinantem BSP aus EBNA-293-Zellen wurde in Form eines ELISA-ähnlichen Festphasenbindungsassays untersucht. Dazu wurde Collagen I (pepsinextrahiert aus Rinderhaut, CELLON) in verschiedenen Formen und Konzentrationen (20 µg/ml in 1% Essigsäure, 500 µg/ml 30 min bei 60°C hitzedenaturiert, 500 µg/ml Fibrillen in HEPES-Puffer, pH 7,4, (s. 3.3.11)) über Nacht bei 4°C an die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockierung noch freier Plastikbindungsstellen für 2 Stunden mit 1% Casein in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) (200 µl pro Loch) wurde rekombinantes BSP (10 µg/ml in TBS) als Ligand für 1,5 Stunden hinzugegeben und die Bindung an das Collagen mit Hilfe des monoklonalen BSP-Antikörpers (Immundiagnostik) in Form eines ELISAs (s. 3.4.5) untersucht. Alle Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in einem Volumen von 100 µl pro Loch. Als Negativkontrolle wurde das Plastik nur mit Casein beschichtet verwendet und als Positivkontrolle wurde die Platte mit rekombinantem BSP in einer Konzentration von 1 µg/ml beschichtet. Um den Einfluss von zweiwertigen Kationen auf die BSP-Collagen I-Bindung zu

untersuchen, wurden für einige Assays alle Lösungen mit 5 mM CaCl_2 oder mit 0,5 mM ZnCl_2 versetzt.

Als Positivkontrolle für die Funktion des Assaysystems wurde rekombinantes COMP als Ligand verwendet, dessen Bindung an Collagen I bereits gezeigt wurde (Thur et al., 2000). COMP wurde in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, die Blockierung der Plastikbindungsstellen erfolgte mit 1 % BSA, als Primärantikörper wurde ein polyklonales Kaninchenantiserum gegen bovines COMP (Di Cesare et al., 1994) 1:1600 verdünnt in Blockierungslösung verwendet, der Sekundärantikörper war Peroxidase-konjugiert (Schwein anti Kaninchen, DAKO). Ansonsten wurde der Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

3.5 Glykoanalytik

3.5.1 Abspaltung und Isolierung von N-Glykanen

N-Glykane wurden enzymatisch mit Peptid N-Glykosidase F (PNGaseF, Roche) vom BSP abgetrennt. Das Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung aller N-Glykan-Typen von Asparaginen der Glykoproteine. Für den Verdau wurden 20-200 μg BSP mit Ethanol gefällt (s. 3.3.1.1) und das getrocknete Pellet in 5 μl Lösung A (1% SDS, 0,5% β -Mercaptoethanol, 0,1 M EDTA) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 40 μl Lösung B (0,2 M Natriumphosphat, pH 8,5) hinzugegeben und das Gemisch für 5 min bei 100°C hitzedenaturiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μl Lösung C (7,5% Nonidet P-40) und einer Unit Peptid N-Glykosidase F, wonach das Gemisch für 18-20 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Um das BSP zusammen mit dem Enzym von den abgespaltenen Oligosacchariden zu entfernen und die N-Glykan-Lösung zu entsalzen, wurde der Verdau nach der Methode von Packer et al. (1998) über eine 150 mg Carbonsäule (Carbograph SPE, Alltech) gegeben. Dazu wurde die Säule zuerst mit 2 ml 100% Acetonitril (ACN), 2 ml 80% ACN in 0,1% TFA und 2 ml H_2O äquilibriert. Anschließend wurde der Verdau auf die Säule gegeben, wonach zur Entfernung von Salzen und Detergens mit 2 ml H_2O gewaschen wurde. Die N-Glykane wurden mit 2 ml 25% ACN in 0,05% TFA eluiert und in einer Speed Vac getrocknet.

3.5.2 Abspaltung und Isolierung von O-Glykanen

O-Glykane wurden mittels wasserfreier Hydrazinolyse unter Verwendung eines Kits (O-glycan release kit, Glyco) vom BSP abgespalten. Dabei wurde die Vorschrift des Herstellers nach Patel et al. (1993) geändert. Zunächst wurden 20-200 µg salzfreies BSP für 24 Stunden lyophilisiert, unter Argon mit 50 µl Hydrazin-Reagenz versetzt und nach Durchmischung für 5 Stunden bei 60°C inkubiert. Das Hydrazin wurde anschließend durch Evaporation unter reduziertem Druck in einem Exsikkator entfernt. Die durch die Hydrazinolyse ebenfalls abgespaltenen N-Acetyl-Gruppen wurden durch Re-N-Acetylierung an denselben Stellen wieder angefügt. Dazu wurden die getrockneten Proben für 15 min bei 4°C mit 2 mM Essigsäureanhydrid in eiskalter gesättigter Bicarbonatlösung inkubiert. Nach Entsalzung des Reaktionsgemisches und Entfernung des Proteins durch das mitgelieferte Ionenaustauscher-harz wurden die O-Glykane in einer Speed Vac getrocknet.

3.5.3 Markierung von Glykanen mit einem Fluoreszenzfarbstoff

N-Glykane und O-Glykane wurden nach der Methode von Bigge et al. (1995) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (Fluka, 2-AB wurde zweimal in Ethanol rekristallisiert und unter Argon bei -20°C gelagert) markiert. Dazu wurden die getrockneten Glykane (s. 3.5.1, 3.5.2) in 2 µl 1 M 2-Aminobenzamid in 100% Essigsäure und 3 µl 2 M NaCNBH₄ (Sigma) in DMSO resuspendiert. Nach Inkubation für zwei Stunden bei 60°C wurde das Gemisch auf Chromatografiepapier (Schleicher und Schuell) aufgetropft und überschüssige Markierungsreagenzien durch Chromatografie in n-Butanol : Ethanol : H₂O (4:1:1) abgetrennt. Da die Glykane unter diesen Bedingungen nicht wandern, wurden die Applikationspunkte nach Trocknung des Chromatografiepapiers ausgeschnitten und die fluoreszenzmarkierten Glykane mit 200-500 µl H₂O in Mikrofiltrationsgefäßen eluiert und bei -20°C gelagert.

3.5.4 Verdaus mit Glykosidasen

Um Informationen über die Zusammensetzung der N-Glykane zu bekommen, wurden die 2-AB markierten Oligosaccharide (s. 3.5.3) sequenziell mit spezifischen terminalen Glykosidasen verdaut. Dazu wurden jeweils 20 µl N-Glykane für 18-20 Stunden bei 37°C in 50 mM Natriumcitrat, pH 4,5, mit jeweils 1 µl Neuraminidase (NEB), + β-Galaktosidase (X-5013, Glyco), + β-N-Acetylhexosaminidase (X-5003, Glyco) und + α-Fukosidase (X-5006,

Glyco) verdaut, wobei die Zugabe einer neuen Glykosidase die Existenz der jeweils vorhergehenden Glykosidasen im Reaktionsansatz verlangte. Die Verdauungen wurden in einer Speed Vac getrocknet. Analog hierzu wurden 2-AB markierte O-Glykane (s. 3.5.3) mit Neuraminidase verdaut.

Zur Analyse mittels SDS-PAGE (s. 3.3.1.2) und Immunoblot (s. 3.4.2) wurden jeweils 300 ng rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen mit Peptid N-Glykosidase F (Roche), mit Endoglykosidase H (Roche), mit Neuraminidase (Roche) und mit Chondroitinase ABC (Seikagaku) über Nacht bei 37°C verdaut. Der N-Glykosidase F-Verdau erfolgte mit 1 U Enzym in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl), 0,1% SDS, 0,5% Nonidet P-40, wobei das Protein vor Zugabe des Enzyms für 15 min bei 95°C denaturiert wurde. Der Verdau mit Endoglykosidase H erfolgte mit 5 mU Enzym in 0,1 M Natriumacetat, pH 5,8, 0,02% SDS, 0,1 M β -Mercaptoethanol, wobei das Protein vor Zugabe des Enzyms für 15 min bei 95°C denaturiert wurde. Zur Behandlung mit Neuraminidase wurde das Protein in 0,1 M Natriumacetat, pH 5,8, aufgenommen und mit 5 mU Enzym versetzt. Der Chondroitinase-Verdau fand in TBS, pH 7,4, unter Zugabe von 16 mU Enzym statt. Zur Kontrolle wurde jeder Ansatz ohne Enzym identisch behandelt. Anschließend wurden alle Proben in SDS-Probenpuffer (s. 3.3.1.2) aufgenommen.

3.5.5 HPLC-Analyse von fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden

Für die Analyse wurde eine Beckman Gold HPLC-Station zusammen mit einem Shimadzu RF-10A XL Fluoreszenzdetektor und der Beckman Gold Nouveau Software verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei 330 nm, die Emissionswellenlänge bei 420 nm. Alle Ammoniumformiatpuffer wurden hergestellt, indem 50 mM, 0,25 M oder 0,5 M Ameisensäurelösungen mit 25%iger wässriger Ammoniaklösung auf pH 4,4 bzw. pH 9,0 eingestellt wurden.

Für die Normalphasen-HPLC wurde eine Aminophasensäule auf Polymerbasis (astec NH₂ polymer, 5 μ m, 4,6 x 250 mm) eingesetzt. Die 2-AB markierten Oligosaccharide (s. 3.5.3) wurden in einem Volumen von 20 μ l in 75% Acetonitril (ACN) in H₂O auf die Säule gegeben. Der lineare Gradient für die Elution der N-Glykane begann bei 68% ACN, 32% 50 mM NH₄HCO₂, pH 4,4, stieg über 60 min bis 50% ACN, 50% 50 mM NH₄HCO₂, pH 4,4, und über weitere 3 min bis 100% 50 mM NH₄HCO₂, pH 4,4, bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die O-Glykane wurden mit einem linearen Gradienten von 80% ACN, 20%

0,25 M NH_4HCO_2 , pH 4,4, bis 20% ACN, 80% 0,25 M NH_4HCO_2 , pH 4,4, über einen Zeitraum von 120 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert.

Für die Ionenaustauscher-HPLC wurde eine Ionenaustauschersäule auf Polymerbasis (Beckman, Q HyperD10, 10 μm , 4,6 x 100 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die 2-AB markierten N-Glykane (s. 3.5.3) wurden in einem Volumen von 20 μl H_2O auf die Säule gegeben, die eingesetzten Puffer waren H_2O (Puffer A) und 0,5 M NH_4HCO_2 , pH 9,0, (Puffer B). Eluiert wurde mit 0% B für 1 min, von 0-5% B für 12 min, von 5-21% B für 13 min, von 21-80% B für 25 min und 80-100% B für 4 min.

Die verwendeten 2-AB-markierten Standard-Oligosaccharide wurden entweder kommerziell erworben (A2GOFB, A4GO, Glyco) oder von Stefan Müller präpariert (Fetuin, Transferrin, 3'Sialyl-N-Acetyllaktosamin).

3.5.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch auf einem REFLEX III Massenspektrometer von Bruker durchgeführt.

Zur Analyse der N-Glykan-Massen wurden die Oligosaccharide, wie in Punkt 3.5.1 beschrieben, isoliert. Die O-Glykane wurden nach Methylierung durch β -Elimination vom BSP abgespalten und die Masse der permethylierten Glykane ermittelt.

Zur Lokalisierung der O-Glykosylierungsstellen von rekombinantem BSP wurden die O-Glykane durch sequenziellen Verdau des Proteins mit Neuraminidase, β -Galaktosidase und β -N-Acetylhexosaminidase bis auf das core-GalNAc entfernt. Das partiell deglykosylierte Protein wurde danach durch Behandlung mit Trypsin und V8-Protease in Peptidfragmente gespalten. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden die Massen der Peptide bestimmt und ein Teil der Peptide wurde mittels PSD-MALDI-TOF-Massenspektrometrie sequenziert.

Für die Molekulargewichtsbestimmung des rekombinanten Proteins wurden 5 μg BSP aus EBNA-293 Zellen in 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0, mit 1 U Peptid N-Glykosidase F (Roche) über Nacht bei 37°C verdaut und in der Speed Vac eingetrocknet. Unverdautes Protein wurde in gleicher Menge für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Herstellung von BSP

Zur rekombinanten Herstellung von BSP wurde ein eukaryotisches Expressionssystem gewählt, um zu gewährleisten, dass die posttranslationalen Modifikationen sowie die native Struktur und Funktion des Proteins erhalten bleiben.

4.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Um die Aufreinigung des rekombinanten BSPs zu erleichtern, wurden vier verschiedene Vektorkonstrukte des pCEP-Pu Expressionsvektors (Kohfeldt et al., 1997) hergestellt (s. Abb. 5). Alle Konstrukte enthalten das Signalpeptid des extrazellulären Proteins BM-40 (Osteonectin), weil es die zuverlässige Sekretion von Proteinen aus Zellen vermittelt. Zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie wurde eine his_6 -Sequenz und eine myc-Sequenz sowie die Glutathion-S-Transferase-Sequenz N-terminal von dem zu exprimierenden Protein eingefügt. Das GST wurde neben seiner Nützlichkeit bei der Aufreinigung auch gewählt, weil es aufgrund seiner globulären Faltung rekombinante Proteine zusätzlich stabilisieren kann. Der Hintergrund war, dass es bis zu diesem Zeitpunkt nicht gelungen ist, BSP in voller Länge im pET-Vektor oder in anderen bakteriellen Expressionssystemen herzustellen (Stubbs, 1996). Um die his_6 -myc und GST-Sequenzen nach der Aufreinigung wieder entfernen zu können, wurden zwei verschiedene Protease Schnittstellen (Enterokinase bzw. Faktor X) vor die cDNA des zu exprimierenden Proteins kloniert (s. Abb. 5). Alle Konstrukte funktionieren auch in der Praxis und sind bereits erfolgreich für die Expression und Aufreinigung verschiedener Proteine eingesetzt worden. Die Sequenzen der neu klonierten Vektorelemente sind im Anhang aufgeführt.

4.1.2 Amplifikation und Klonierung der cDNA für humanes BSP

Die cDNA für humanes BSP ohne eigenes Signalpeptid wurde mittels PCR aus dem von L. Fisher zur Verfügung gestellten Vektor B6-5g (Fisher et al., 1990) amplifiziert, durch die entsprechenden Primer mit den Restriktionsschnittstellen *Nhe* I und *Not* I versehen und in die multiple Klonierungsstelle der vier in Punkt 4.1.1 beschriebenen Vektoren einkloniert. Die Überprüfung der Klonierung mittels Sequenzierung beider Stränge ergab die Bestätigung

des korrekten Leserasters sowie die Übereinstimmung mit der publizierten cDNA-Sequenz (Fisher et al., 1990). Fünf Aminosäureaustausche, die von Kim et al. (1994) berichtet wurden, konnten nicht bestätigt werden.

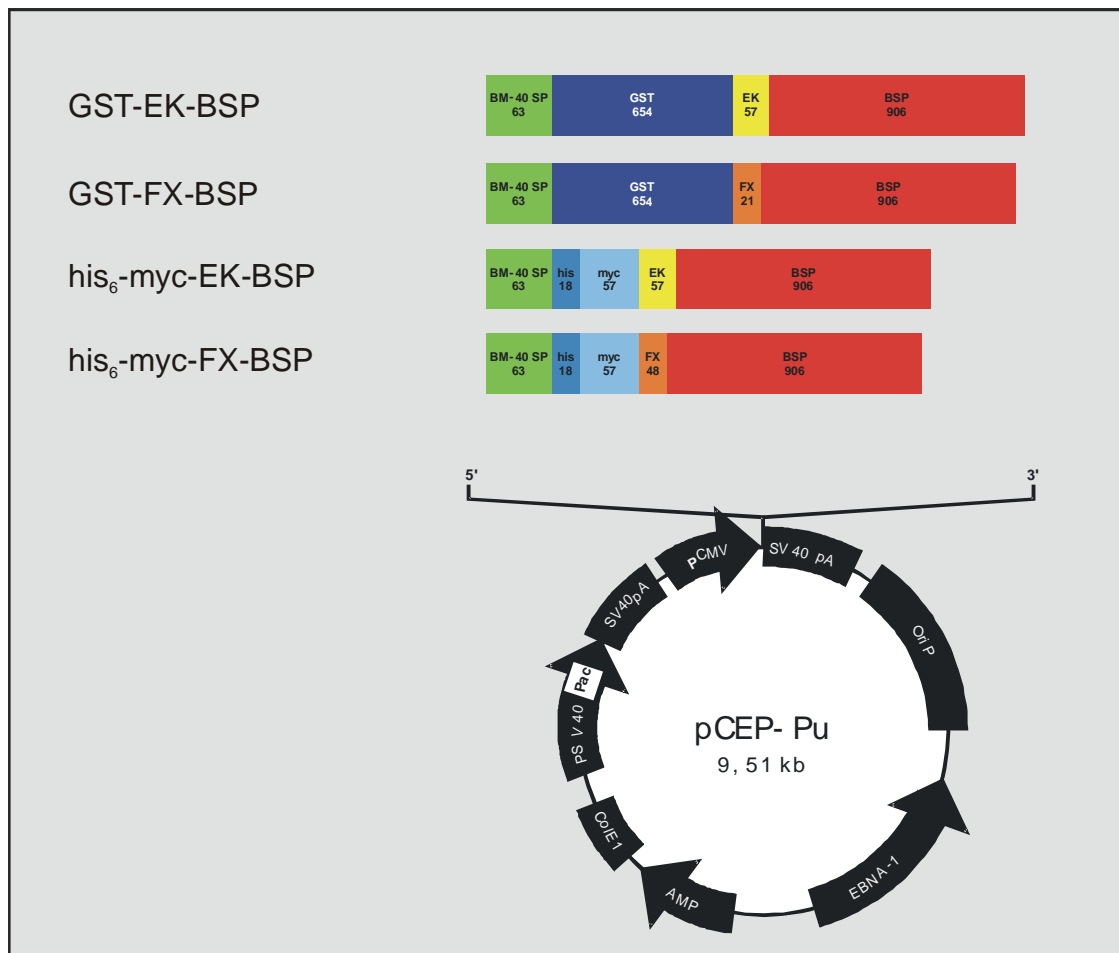


Abb. 5: Eukaryotischer Expressionsvektor pCEP-Pu.

Vergrößert dargestellt und mit der Länge der Nukleotidsequenz bezeichnet sind das Signalpeptid von BM-40 (BM-40 SP), das Glutathion-S-Transferase-Element (GST), das his₆-Element (his), das myc-Element (myc), die Protease-schnittstellen für Enterokinase (EK) und Faktor X (FX) sowie die cDNA für humanes BSP (BSP).

4.1.3 Transfektion

Die vier verschiedenen BSP-Expressionsvektorkonstrukte wurden mittels Lipid-vermittelter Transfektion in unterschiedliche humane Zell-Linien eingeführt. Die embryonale Nierenzell-Linie EBNA-293 wurde gewählt, weil sie zusätzlich zu dem Vektor ein EBNA-1 Gen stabil im Genom integriert besitzt, wodurch die Expressionsrate im Vergleich zu anderen Zellen erhöht

ist. Um möglichst knochenähnliche posttranslationale Modifizierungen zu erhalten, wurden die drei Osteosarkomzell-Linien MG-63, MHH-ES1 und SAOS-2 transfiziert. Außerdem wurden die Mammakarzinomzell-Linien MCF-7, MDA-MB-231, T47-D und ZR75-1 zur rekombinanten Herstellung von Brusttumor-ähnlichem Material gewählt. Da die rekombinanten Proteine aufgrund des BM-40 Signalpeptids ins Medium sezerniert werden, konnte eine erfolgreiche Expression mittels SDS-PAGE und Immunoblot von serumfreien Kulturüberständen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Zell-Linie		Rekombinante BSP-Expression
Nieren	- EBNA-293	+
Osteosarkom	- SAOS-2	-
Osteosarkom	- MG-63	-
Osteosarkom	- MHH-ES1	+
Mammakarzinom	- MCF-7	+
Mammakarzinom	- T47-D	+ (transient)
Mammakarzinom	- ZR75-1	+ (transient)
Mammakarzinom	- MDA-MB-231	+ (transient)

Tab. 8: Rekombinante BSP-Expression nach Transfektion verschiedener Zell-Linien.

Nach Transfektion und Selektion wurde je 1 ml serumfreier Kulturüberstand mit TCA gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen BSP detektiert. Bei den mit (transient) gekennzeichneten Zell-Linien erfolgte der Nachweis der Expression zwei Tage nach Transfektion ohne Selektion.

Von den Osteosarkomzell-Linien exprimierten, auch nach wiederholten Transfektionsversuchen, ausschließlich die MHH-ES1 Zellen rekombinantes BSP in geringen Mengen. Bei den Mammakarzinomzell-Linien wurde die MCF-7 Zell-Linie zur stabilen episomalen BSP-Expression gewählt, weil diese nach transienter Transfektion im Vergleich zu den drei anderen Brustkrebszell-Linien die höchste BSP-Expression zeigte. Wie erwartet, wurde von allen ausgewählten Zell-Linien rekombinantes BSP in größten Mengen von EBNA-293 Zellen exprimiert. Exemplarisch ist in Abbildung 6 ein Immunoblot mit serumfreien Zellkulturüberständen transfizierter EBNA-293 Zellen dargestellt.

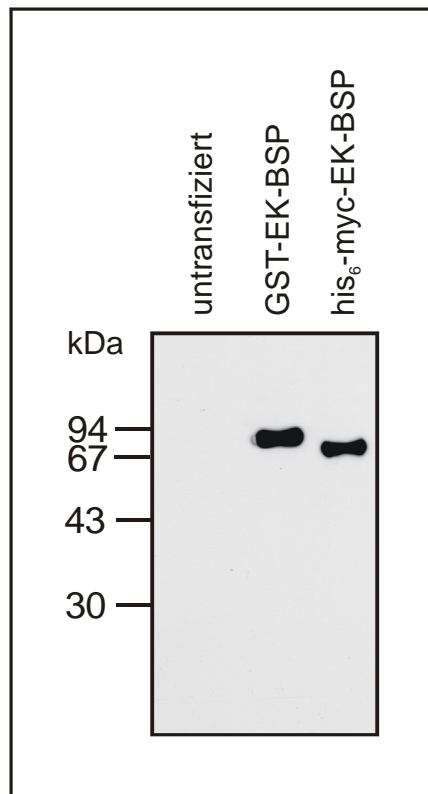


Abb. 6: Serumfreie Zellkulturüberstände transfizierter EBNA-293 Zellen.

Je 30 µl Zellkulturüberstand untransfizierter EBNA-293 Zellen (Negativkontrolle) und Überstände von mit verschiedenen Expressionsvektorkonstrukten (GST-EK-BSP und his₆-myc-EK-BSP) transfizierten EBNA-293 Zellen wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und BSP mittels Immunoblot unter Verwendung des monoklonalen Mausantikörpers detektiert. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind in kDa angegeben.

Die unterschiedlichen Größen resultieren aus den entsprechenden Längen der verschiedenen Vektorelemente (GST mit 218 und his₆-myc mit 25 Aminosäuren). Für das exprimierte GST-Fusionsprotein konnte mit Hilfe eines spektroskopischen Nachweises gezeigt werden, dass die Glutathioin-S-Transferase ihre enzymatische Aktivität noch besitzt (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Aufreinigung

Das rekombinant exprimierte BSP wurde direkt aus serumfreien Zellkulturüberständen transfizierter Zellen aufgereinigt. Vorversuche mit den GST-Fusionsproteinen, welche mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt wurden, ergaben keine quantitative Bindung des Materials an die Säulenmatrix, d. h. obwohl ein kleiner Anteil an die Säule gebunden hat und

nach Elution mit Glutathion sauber war, befand sich der größte Teil im Durchfluss. Weil das Ziel jedoch darin bestand, rekombinantes BSP im µg bis mg Maßstab aufzureinigen, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Die Vorversuche mit den his₆-myc-BSP-Fusionsproteinen, welche über Nickel-Sepharose aufgereinigt wurden, ergaben die gewünschte quantitative Bindung, weshalb diese Methode weiter optimiert wurde. Die wichtigsten Schritte sind am Beispiel der transfizierten EBNA-293 Zellen in Abbildung 7 zusammengefasst.

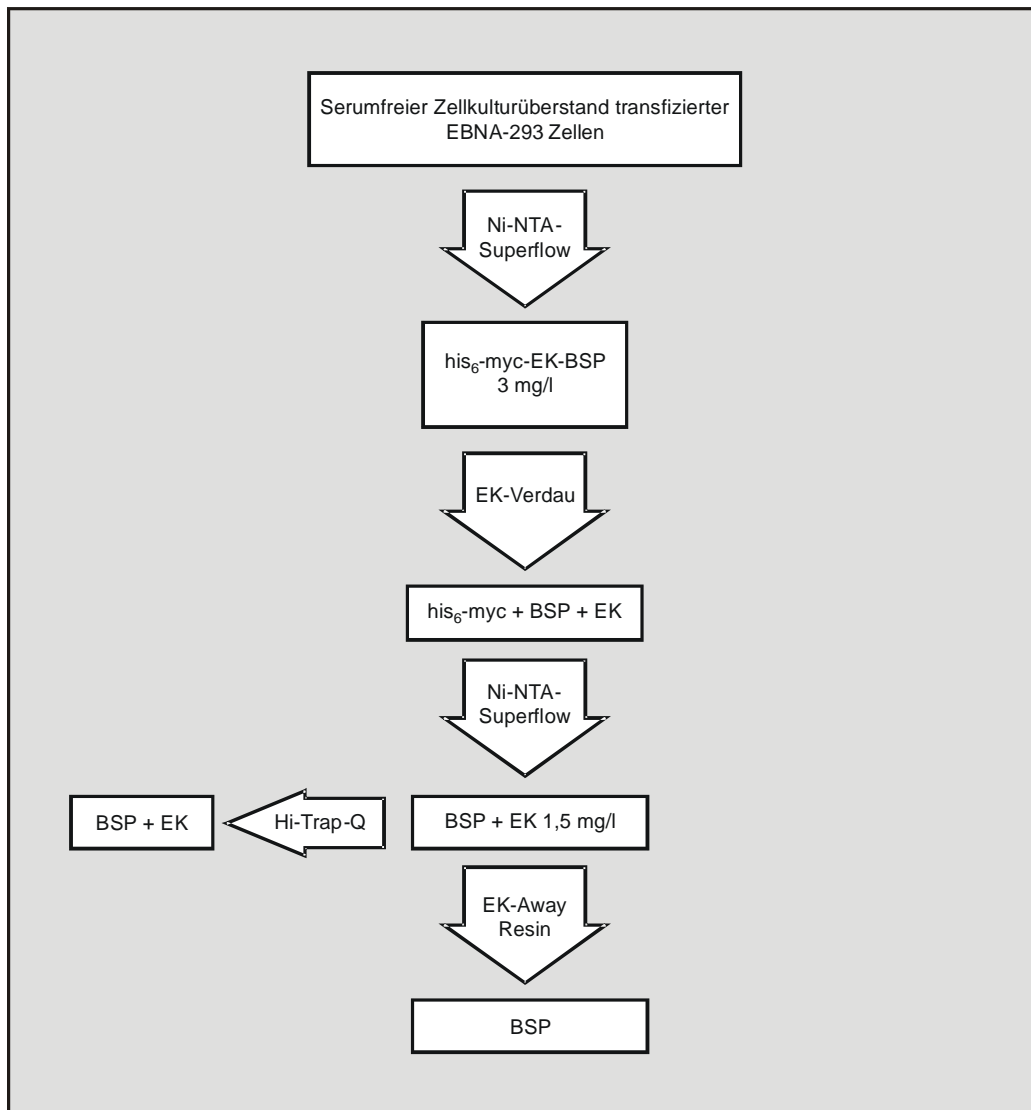


Abb. 7: Optimierte Aufreinigungsbedingungen für his₆-myc-BSP.

Erläuterungen im Text.

Ausgangsmaterial war serumfreier Zellkulturüberstand, welcher direkt über eine Metall-Affinitätssäule, die mit Nickel-NTA (Nitrilotriacetic acid) Sepharose CL-6B gepackt war,

gepumpt wurde. Nach dem Waschen der Säule wurde das his₆-myc-BSP mit Hilfe eines Imidazolstufengradienten eluiert. Die Fraktionen mit dem höchsten BSP-Gehalt wurden bei 20 mM Imidazol eluiert. Die Ausbeute pro Liter serumfreien Zellkulturüberstands betrug nach diesem Schritt 3 mg für EBNA-293-Zellen und jeweils 100 µg für MHH-ES1 und MCF-7 Zellen. Des Weiteren wurde bei dem Fusionsprotein aus EBNA-293 Zellen die his₆-myc-Sequenz mittels Enterokinaseverdau abgeschnitten und mit Hilfe einer zweiten Nickel-Säule vom BSP abgetrennt. Das so aufgereinigte BSP wurde in einer Ausbeute von 1,5 mg pro Liter serumfreien Zellkulturüberstands erhalten. Die jetzt noch vorhandenen geringen Mengen an Enterokinase stören bei vielen Untersuchungen nicht, weshalb man das BSP für diese Zwecke z. B. über eine Hi-Trap-Q Säule aufkonzentrieren konnte. Für eine biologische und funktionelle Charakterisierung war die Entfernung der Enterokinase notwendig. Dies erfolgte mit Hilfe des Enterokinase-Away-Resins von Invitrogen. Dabei handelt es sich um eine Matrix, an die der Trypsin Inhibitor aus der Sojabohne gekoppelt ist, welcher eine hohe Affinität für die Enterokinase hat. Falls das BSP mit und ohne his₆-myc-Sequenz gleiche biochemische und funktionelle Eigenschaften haben sollte, reduziert sich die Aufreinigung von rekombinantem BSP auf einen Nickelsäulen-Chromatographieschritt.

Die Homogenität des aufgereinigten rekombinanten BSPs wurde nach Auftrennung mittels SDS-PAGE durch Coomassiefärbung und Silberfärbung gezeigt (s. Abb. 8). Nach Abschneiden der his₆-myc-Sequenz sieht man einen kleinen Größenunterschied, der der Länge dieser Fusionspeptidelemente (44 Aminosäuren) entspricht.

Anschließend wurde die vollständige Entfernung der his₆-myc-Sequenz mittels Immunoblot überprüft (s. Abb. 9). Sowohl his₆-myc-BSP als auch rekombinantes BSP ohne his₆-myc-Sequenz ergaben ein positives Signal mit dem BSP-Antikörper (s. Abb. 9 a), während der myc-Antikörper ausschließlich mit dem his₆-myc-BSP reagierte (s. Abb. 9 b). Deshalb kann man von der vollständigen Entfernung dieses Elements durch Enterokinase-Behandlung und zweiter Nickelsäule ausgehen. Eine Bande, die dem abgeschnittenen his₆-myc-Element entspricht, ist auf diesem Immunoblot aufgrund der geringen Größe nicht zu erkennen.

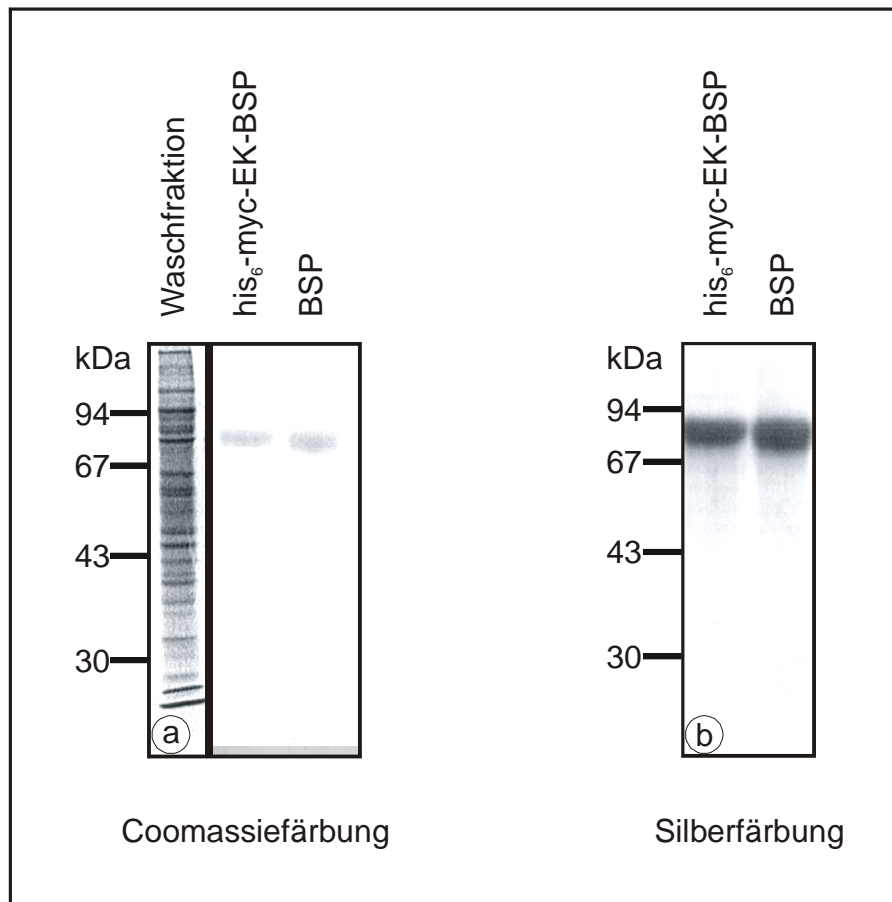


Abb. 8: Nickel-affinitätsgereinigtes rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen.

Pro Spur wurden jeweils 1 µg his₆-myc-EK-BSP und BSP ohne his₆-myc-EK-Sequenz in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Das linke Gel (a) wurde mit Coomassie gefärbt, das rechte Gel (b) mit Silber. Zum Vergleich wurden in Gel a 30 µl einer Waschfraktion der Nickelsäule aufgetragen. Jeweils links von den Gelen sind die Positionen des Molekulargewichtsstandards in kDa eingezeichnet.

Das so aufgereinigte rekombinante BSP wurde zur biochemischen und funktionellen Charakterisierung eingesetzt, wobei der Hauptanteil der Daten mit BSP aus EBNA-293 Zellen erhalten wurde, weil dieses in den größten Mengen vorlag.

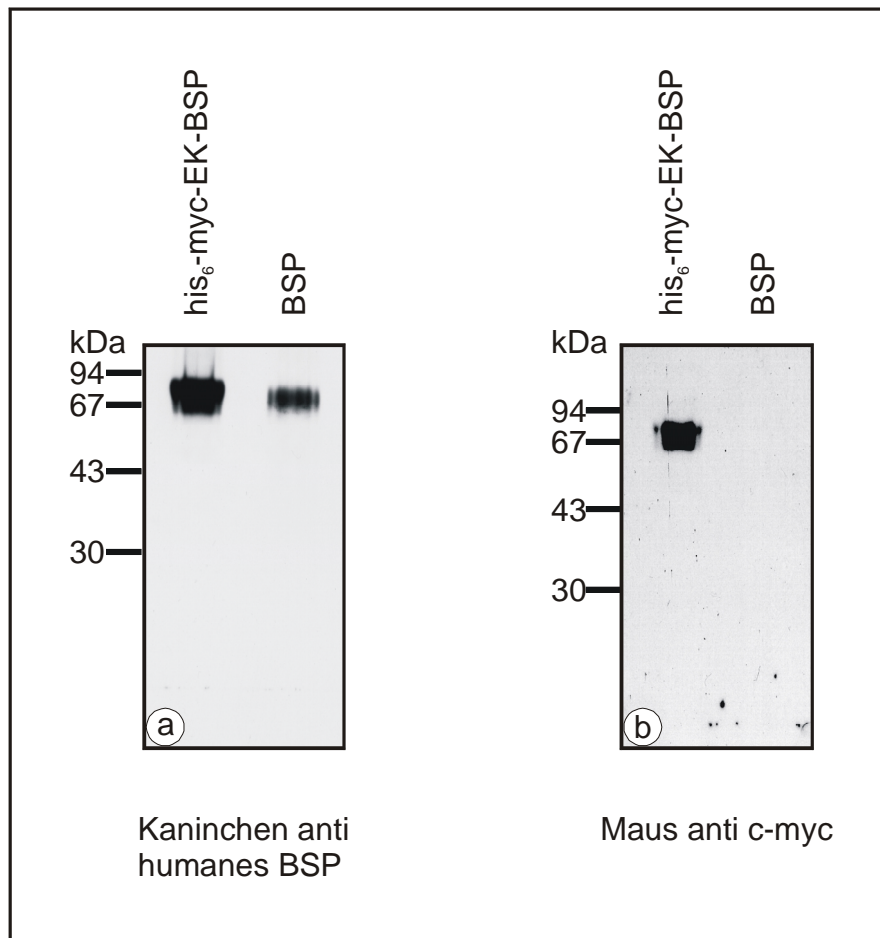


Abb. 9: Nachweis der Entfernung der his₆-myc-Sequenz.

Pro Spur wurden 1 µg rekombinantes his₆-myc-EK-BSP und BSP ohne his₆-myc-Sequenz aus EBNA-293 Zellen aufgetragen, mittels SDS-PAGE auf einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen BSP (a) und mit dem monoklonalen Antikörper gegen myc (b) detektiert.

4.2 Aufreinigung von BSP aus humanen Knochen

BSP wurde unter nativen Bedingungen aus humanen Knochen isoliert. Dazu wurde Knochenmehl zur Entfernung von Blutresten mit Gu-HCl extrahiert und danach gründlich mit Trispuffer gewaschen, um das Gu-HCl vollständig zu entfernen und die weitere Extraktion unter nativen Bedingungen zu ermöglichen. Die nicht-collagenartigen Proteine wurden durch mehrmalige Extraktion mit EDTA freigesetzt, gegen Trispuffer dialysiert und das BSP mittels Anionenaustauscherchromatografie auf einer DEAE-Sepharose-Fast-Flow-Säule und einer ResourceQ-Säule vorgereinigt. Abschließend wurde das BSP aus humanen Knochen entweder mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung des monoklonalen BSP-Antikörpers oder durch Reversed-Phase-HPLC-Chromatografie bis zur Homogenität gereinigt.

Die Ausbeute betrug ca. 400 µg BSP pro 150 g Knochenmehl. Da das aus Knochen isolierte BSP nicht mit Coomassie und nur schlecht mit Silber angefärbt wird, ist in Abbildung 10 zusätzlich ein Immunoblot gezeigt.

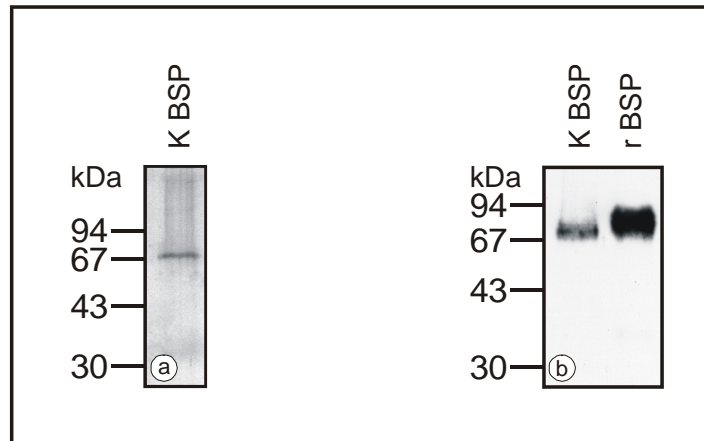


Abb. 10: Aus humanen Knochen aufgereinigtes BSP.

1,5 µg BSP aus Knochen (K BSP) wurden nach Auftrennung in einem 10%igen SDS-Gel mit Silber gefärbt (a). Im Immunoblot (b) wurden 0,5 µg BSP aus Knochen (K BSP) und zum Vergleich 0,5 µg rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen (r BSP) mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen BSP detektiert. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind jeweils links von den Gelen in kDa angegeben.

Das mit Silber gefärbte Gel zeigt eine scharfe Bande oberhalb von 67 kDa, die im Immunoblot von dem BSP-Antikörper erkannt wird. Außerdem ist im Immunoblot zu erkennen, dass das aus Knochen isolierte BSP etwas unterhalb des rekombinanten Materials läuft, was auf Unterschiede in den posttranslationalen Modifizierungen hindeutet. Die unterschiedlich starke Immunreaktion mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper spiegelt entweder Unterschiede der beiden BSPs wider oder ist auf Abweichungen bei den verschiedenen Methoden der Konzentrationsbestimmung (s. 4.3.2) zurückzuführen.

4.3 Biochemische Charakterisierung

4.3.1 N-terminale Proteinansequenzierung

Die N-terminale Ansequenzierung des rekombinanten BSPs ergab eine Teilsequenz, die mit der publizierten Aminosäuresequenz (Fisher et al., 1990) übereinstimmt. Die beiden N-terminalen Aminosäuren L und A resultieren aus der Klonierung der Expressionsvektorelemente (s. 3.1.2), bei der hinter der Enterokinaseschnittstelle eine *Nhe* I-Restriktionschnittstelle eingeführt wurde. Dass das C-terminale Ende im rekombinanten Protein enthalten ist, kann man aus der positiven Immunreaktion mit dem monoklonalen Mausantikörper schließen, da dieser an die C-terminalen Aminosäuren 264-301 bindet. In Abbildung 11 ist die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen BSPs ohne Signalpeptid, die für die Herstellung des rekombinanten Proteins verwendet wurde, dargestellt.

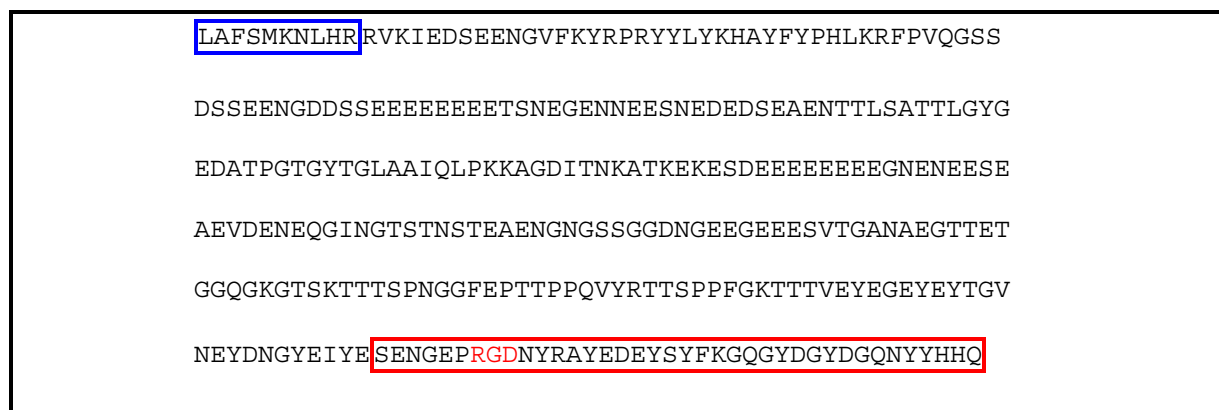


Abb: 11: Aminosäuresequenz des rekombinant exprimierten BSPs.

Umrahmt ist der N-terminal ansequenzierte Bereich des rekombinanten BSPs nach Enterokinaseverdau und der C-terminale Bindungsbereich des monoklonalen BSP-Antikörpers (Aminosäuren 264-301).

4.3.2 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration des rekombinanten BSPs wurden UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 240–350 nm aufgenommen. Aus der Differenz der Absorptionen bei 280 nm und 320 nm ließ sich mit Kenntnis des theoretischen Molekulargewichts (33628,5 Da) und unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm

($\epsilon_{280} = 29440 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Gill et al., 1989) die Konzentration nach dem Lambert Beer'schen Gesetz ausrechnen.

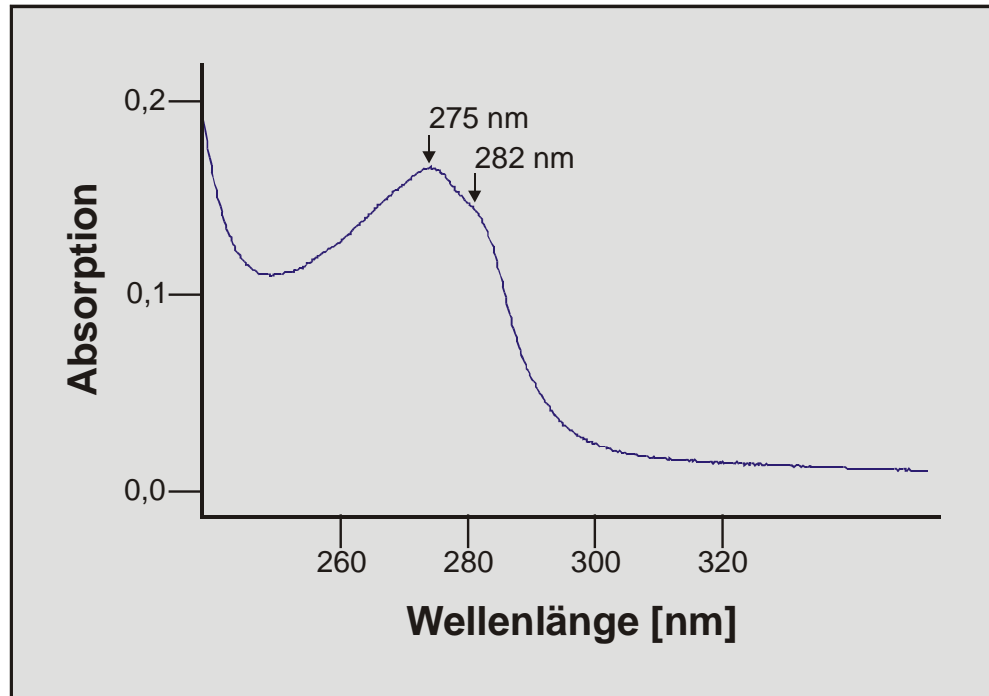


Abb. 12: UV-Spektrum von rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen.

Die Kurve repräsentiert aufgereinigtes rekombinantes his₆-myc-BSP in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Das UV-Spektrum von rekombinantem BSP (s. Abb. 12) ist ein typisches Tyrosinspektrum, was daran zu erkennen ist, dass das Absorptionsmaximum bei 275 nm liegt und bei 282 nm die für Tyrosin charakteristische Schulter folgt. Von den insgesamt 301 Aminosäuren des BSPs machen die 23 Tyrosine einen Anteil von 7% aus. Tryptophane, die das Absorptionsmaximum in Richtung 280 nm verschieben würden, sind im BSP nicht vorhanden. Mit der so bestimmten Konzentration lagen die Nachweisgrenzen für rekombinantes BSP bei 5 ng im Immunoblot und bei < 5 pg im ELISA, wobei der monoklonale und verschiedene polyklonale Antikörper getestet wurden.

Die Konzentration von BSP aus humanen Knochen, wurde mit Hilfe des BCA-Proteinbestimmungsassays gemessen. Um die beiden Arten der Konzentrationsbestimmung miteinander vergleichen zu können, wurde anhand einer Eichkurve mit BSA die Konzentration von rekombinantem BSP mit dem BCA-Assay bestimmt und mit den durch UV-Absorption ermittelten Daten verglichen (s. Tab. 9). Die beiden Proteinbestimmungsmethoden sind im Konzentrationsbereich bis zu 60 µg/ml ähnlich. Bei höheren Konzentra-

tionen treten Abweichungen dahingehend auf, dass die mittels UV-Absorption bestimmte Konzentration höher liegt als die im BCA-Assay ermittelte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Peptidbindungen im BSP aufgrund des hohen Anteils an gebundenen Glykanen für die BCA-Reagenzien schlecht zugänglich sind.

r BSP [$\mu\text{g/ml}$] nach UV-Messung	r BSP [$\mu\text{g/ml}$] nach BSA-Eichkurve im BCA-Assay
30	35
60	49
120	63

Tab. 9: Vergleichende Konzentrationsbestimmung nach UV-Messung und BCA-Assay.

Die Menge an rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen wurde nach Konzentrationsbestimmung mittels Aufnahme eines UV-Spektrums im BCA-Proteinbestimmungsassay anhand einer mit BSA ermittelten Eichkurve bestimmt.

4.3.3 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung des rekombinanten BSPs erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Aufgrund der heterogenen Glykosylierung war die Massenverteilung sehr breit und zwar von 40 kDa bis 75 kDa mit einer mittleren Masse von 57 kDa (s. Abb. 13). Im 10%igen SDS-Gel war das his₆-myc-BSP als Bande bei ca. 84 kDa und das BSP ohne his₆-myc-Sequenz bei ca. 82 kDa detektierbar (s. Abb. 8). Das aus der humanen cDNA abgeleitete Molekulargewicht beträgt 33628,5 Da und aus humanen Knochen isoliertes BSP ist als Bande bei ca. 70 kDa im SDS-Gel zu sehen (s. Abb. 10). Vermutlich tragen die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen zur aberranten Migration in der SDS-PAGE bei. Der Verdau des rekombinanten BSPs mit Peptid N-Glykosidase F, einem Enzym, das die hydrolytische Spaltung aller N-Glykan-Typen von Asparaginen der Glykoproteine katalysiert, führte zu einer Massenveränderung von 4,7 kDa nach 52 kDa. Auch das N-Glykosidase F behandelte BSP stellte sich als breiter Peak zwischen 40 kDa und 65 kDa im Massenspektrum dar, wobei heterogene O-Glykosylierung die wahrscheinliche Ursache ist (s. 4.3.5.2). Nach Verdau des Proteins mit Endoglykosidase H, einem Enzym, das ausschließlich mannosereiche N-Glykane abspaltet, war keine Massenveränderung detektierbar (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man ableiten, dass auf

BSP nur N-Glykane vom Komplex-Typ vorkommen. Die Ergebnisse einer detaillierten N-Glykan-Analyse sind in Teil 4.3.5.1 dargestellt.

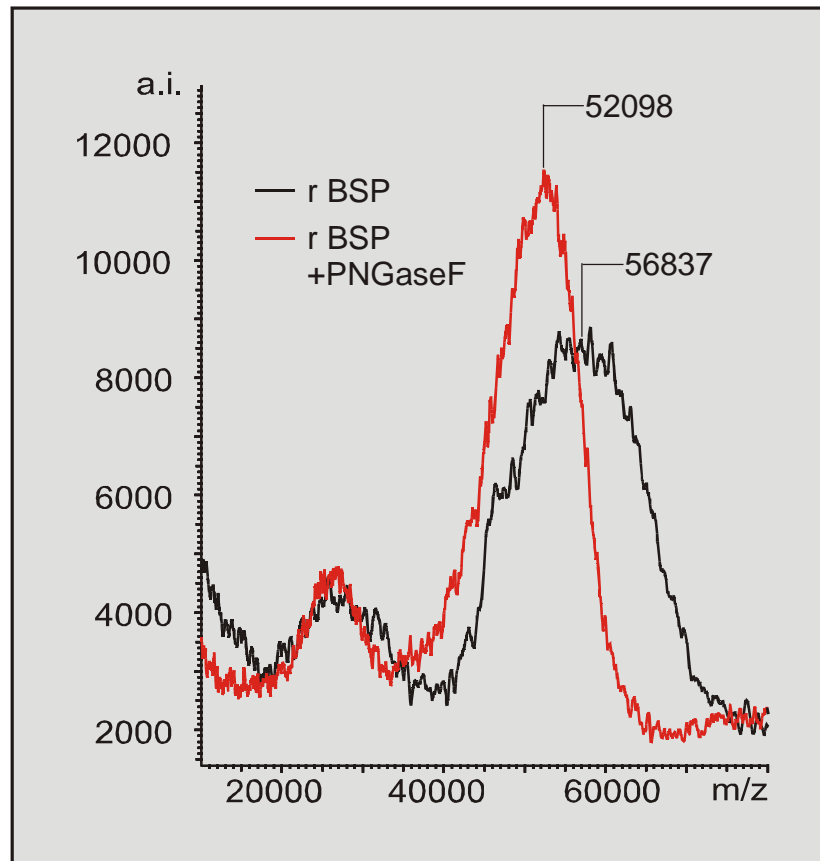


Abb. 13: MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Die Massenverteilung von rekombinantem his₆-myc-BSP aus EBNA-293 Zellen (r BSP) wurde vor und nach Verdau mit Peptid N-Glykosidase F (r BSP + PNGaseF) bestimmt. Auf der Abszisse ist die Masse pro Ladung (m/z) angegeben, die Ordinate repräsentiert die Signalintensität in willkürlichen Einheiten (a.i. = arbitrary intensity).

4.3.4 Sekundärstrukturanalyse und Calciumbindung

Die Analyse der Sekundärstrukturelemente erfolgte mittels CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie, wobei gleichzeitig der Einfluss von Ca²⁺ und P_i Ionen auf die Proteinkonformation untersucht wurde. Weiterhin wurde der Effekt von Calcium auf den Verdau von BSP mit einer Ca²⁺ unabhängig spaltenden Protease analysiert.

4.3.4.1 CD-Spektroskopie zur Analyse der Sekundärstruktur

Die CD-Spektren von rekombinantem BSP und von aus Knochen isoliertem BSP (s. Abb. 14) waren typisch für Proteine mit einem geringen Anteil an α -Helix und β -Faltblatt Elementen. Somit war ein hoher Anteil an Zufallsknäuelstruktur vorhanden. Trotzdem führte die Zugabe von 6 M Gu-HCl zu einem veränderten Spektrum (s. Abb. 14). Das aus humanen Knochen isolierte BSP unterschied sich in seiner Sekundärstruktur deutlich von rekombinantem Protein. Die Analyse der CD-Spektren mit Hilfe des CONTIN Computerprogramms (Provencher et al., 1981) ergab für das rekombinante BSP 9% α -Helix, 37% β -Faltblatt, 19% β -Schleifen und 35% Zufallsknäuelstrukturen. Das CONTIN-analyisierte Spektrum des aus Knochen isolierten BSPs ergab 5% α -Helix, 32% β -Faltblatt, 17% β -Schleifen und 46% Zufallsknäuelstrukturen.

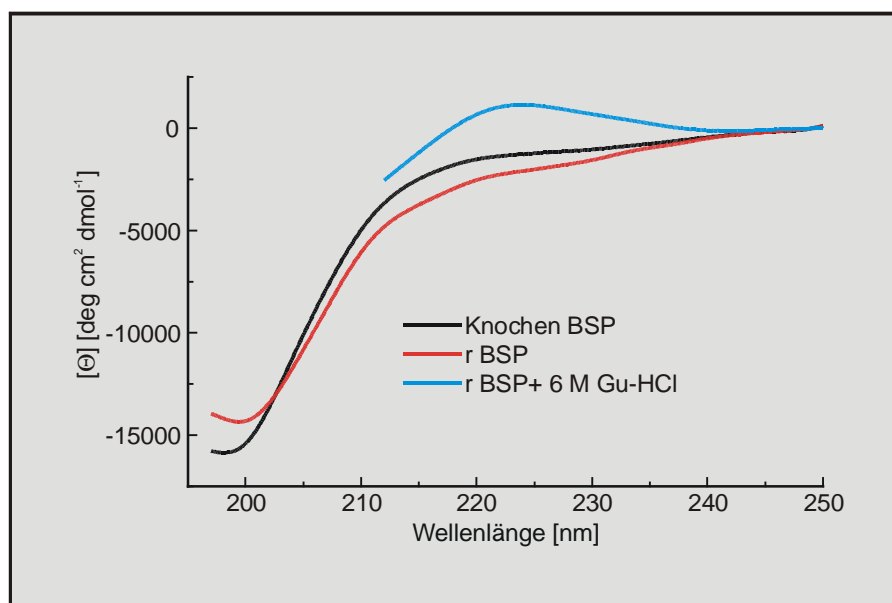


Abb. 14: Vergleich der CD-Spektren verschiedener BSPs.

Die Proteine wurden in Konzentrationen von 0,2 mg/ml (Knochen BSP) und 0,1 mg/ml (rekombinantes BSP, r BSP) in 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, für die CD-Spektroskopie eingesetzt, welche bei 25°C in thermostatisierten Quarzküvetten mit 1 mm Schichtdicke durchgeführt wurde. Der Wellenlängenbereich lag zwischen 190 nm und 250 nm, die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min, einem Datenintervall von 0,1 nm und einer Responsezeit von 4 s aufgezeichnet. Es wurden jeweils fünf Spektren akkumuliert und gemittelt.

4.3.4.2 Einfluss von Calcium auf die Proteinkonformation

Nach Zugabe von 2 mM CaCl_2 zu rekombinantem BSP war nur eine geringfügige Änderung des CD-Spektrums zu erkennen, die in Gegenwart von 20 mM CaCl_2 nicht verstärkt wurde (s. Abb. 15). Der kleine Effekt bei 200 nm war durch Zugabe von EDTA nicht reversibel, woraus man ableiten kann, dass Calcium keinen Effekt auf mittels CD-Spektroskopie messbare Veränderungen der Sekundärstruktur von BSP hat. Die Zugabe von 1,5 mM bzw. 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4, rief ebenfalls keine Veränderung des CD-Spektrums hervor.

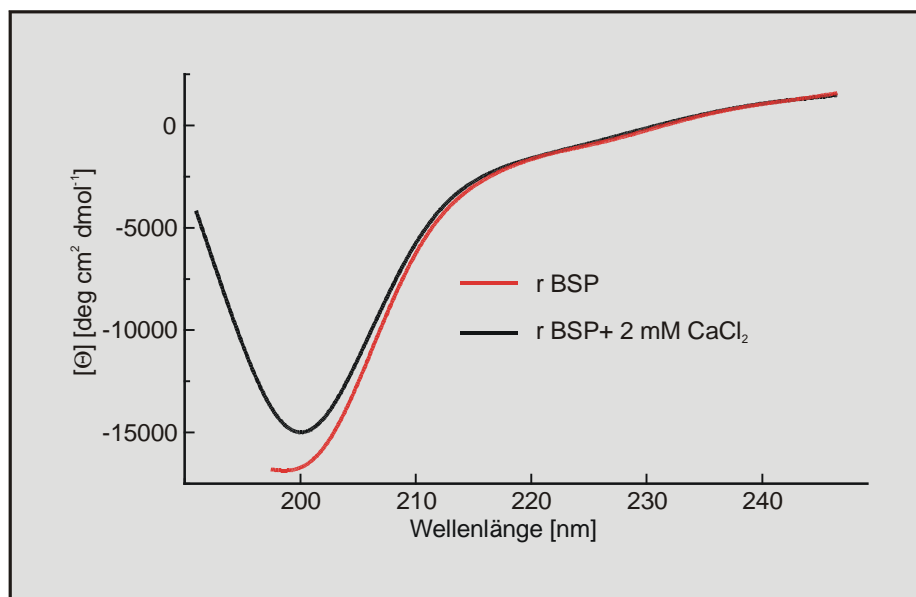


Abb. 15: Einfluss von Calcium auf das CD-Spektrum von BSP.

Abgebildet ist das CD-Spektrum von rekombinantem BSP in 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, (r BSP) und das CD-Spektrum nach Zugabe von 2 mM CaCl_2 (r BSP + 2 mM CaCl_2). Die Kurven nach EDTA- und Natriumphosphat-Zugabe sind nicht gezeigt.

Da es auch Sekundärstrukturveränderungen gibt, die nicht mittels CD-Spektroskopie messbar sind, wurde zusätzlich der Einfluss der Ca^{2+} unabhängig spaltenden Protease α -Chymotrypsin auf den Abbau von BSP in Anwesenheit verschiedener CaCl_2 -Konzentrationen untersucht. Im Folgenden sind die Schnittstellen von α -Chymotrypsin und die Anzahl der entsprechenden Aminosäurereste im BSP angegeben: Bei dem Enzym handelt es sich um eine Serin-Protease, die Peptidbindungen spezifisch C-terminal von Tyrosin (23), Phenylalanin (7) und Tryptophan (0) schneidet und mit etwas geringerer Aktivität auch C-terminal von Leucin (8), Methionin (1), Alanin (14), Asparaginsäure (16) und Glutaminsäure (60) hydrolysiert.

Der proteolytische Verdau von BSP wurde nach verschiedenen Zeitpunkten abgebrochen und die Abbauprodukte mittels Immunoblot untersucht (s. Abb. 16).

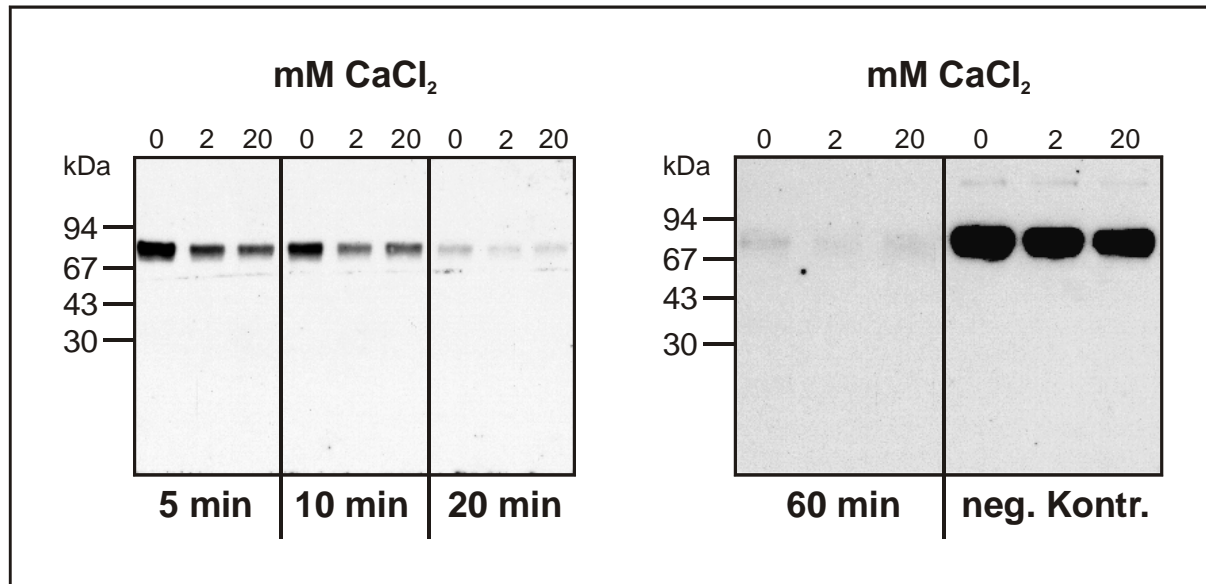


Abb. 16: α -Chymotrypsin-Verdau von rekombinantem BSP.

Jeweils 200 ng rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen wurden für 5 min, 10 min, 20 min und 60 min mit α -Chymotrypsin in Anwesenheit von 0 mM, 2 mM und 20 mM CaCl_2 verdaut. Die Negativkontrolle ohne Enzym wurde für 60 min inkubiert. Die Abbauprodukte wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot unter Verwendung des monoklonalen Mausantikörpers gegen BSP detektiert. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind in kDa jeweils links von jedem Blot angegeben.

BSP wurde aufgrund seiner zahlreichen potenziellen Schnittstellen von α -Chymotrypsin zeitabhängig verdaut. Ein Verdau über 60 min führte zu einem vollständigen Abbau der BSP-Bande bei ca. 84 kDa (s. Abb. 16). Ein partieller Verdau wurde nach 5 min, 10 min und 20 min beobachtet. Zu keinem Zeitpunkt konnten definierte Abbaubanden im Immunoblot nachgewiesen werden, was daran liegen kann, dass die Abbaufragmente entweder zu klein sind und aus dem Gel herauslaufen, oder nicht mit dem Antikörper reagieren. Somit konnte der Verdau nur durch den Abbau der 84 kDa-Bande, die dem BSP voller Länge entspricht, verfolgt werden. Die Intensität der 84 kDa-Bande war im Vergleich zum calciumfreien Verdau in Anwesenheit von 2 mM CaCl_2 etwas niedriger, während die Zugabe von 20 mM CaCl_2 zu keiner weiteren Verringerung der Bande führte. Dies deutet auf eine Calcium induzierte Konformationsänderung beim BSP hin, welche jedoch aufgrund des nur kleinen Effekts nicht weiter untersucht wurde.

4.3.5 Posttranslationale Modifizierungen

Da Kohlenhydrate insgesamt ca. 50% des Gesamtgewichts des Proteins ausmachen (Fisher et al., 1983; Franzén et al., 1985; Midura et al., 1990), wurde bei der Untersuchung der posttranslationalen Modifizierungen des humanen BSPs der Schwerpunkt auf die Analyse der N-Glykane und O-Glykane gelegt. Des Weiteren wurde die Anwesenheit von Chondroitinsulfaten und Phosphaten untersucht.

4.3.5.1 N-Glykane

Die N-Glykane wurden enzymatisch mittels Peptid N-Glykosidase F an den Asparaginresten vom BSP abgetrennt und über eine reduktive Aminierung ihrer Aldehydgruppen kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (2-AB) verbunden. Sialinisierte Strukturen wurden nach ihrer Ladung auf einer HPLC-Anionenaustauschersäule (Q HyperD10) aufgetrennt. Nach enzymatischer Abspaltung aller $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ und $\alpha 2,8$ gebundenen N-Acetylneuraminsäuren mittels Neuraminidase konnten die neutralen N-Glykane mittels Normalphasen-HPLC (NP-HPLC, NH_2 -Polymersäule) nach Hydrophilizität und Größe aufgetrennt werden. Zur Aufklärung der verschiedenen Strukturen wurden die asialo N-Glykane mit spezifischen terminalen Glykosidasen verdaut, wodurch schrittweise alle Glykane auf die gemeinsame Pentasaccharid Grundstruktur abgebaut wurden. Die Abbauprodukte wurden ebenfalls auf der Normalphasensäule aufgetrennt und mit Standard N-Glykanen bekannter Zusammensetzung und Struktur verglichen. Zur Bestätigung der so ermittelten Strukturen wurden zusätzlich die Massen der asialo BSP N-Glykane ermittelt. Tabelle 10 zeigt einen Überblick über die asialo BSP N-Glykanstrukturen, die entsprechenden Massen der Natrium-Addukte sowie die in allen weiteren Darstellungen verwendeten Abkürzungen.

Um die NP-HPLC Profile der BSP N-Glykane mit denen der Standards vergleichen zu können, wurde an jedem Versuchstag ein Oligoglukosestandard unter identischen Bedingungen aufgetrennt. Durch Vergleich der Retentionszeiten der Glukosepeaks mit denen der Standards konnte jede Standardstruktur in Glukoseeinheiten umgerechnet werden. Hierbei wurden sowohl die unregelmäßigen Abstände der Glukosepeaks als auch temperaturbedingte Schwankungen für jeden Versuchstag in die Berechnung mit einbezogen. Analog hierzu wurden die HPLC-Peaks der BSP N-Glykane in Glukoseeinheiten umgerechnet.

Abkürzung	Struktur	Masse der Natrium-Addukte [Da]
M3		n. b.
M3F		n. b.
A2G0F		1485,2
A2G0FB		n. b.
A3G0F		n. b.
A3G0FB		n. b.
A4G0F		n. b.
A2G2F		1810,3
A2G2FB		2013,5
A3G3F		2175,9
A3G3FB		2378,9
A4G4F		2541,0

Tab. 10: Asialo BSP N-Glykan-Strukturen.

Überblick über die nach Verdau mit Neuraminidase und verschiedenen Glykosidasen auftretenden BSP N-Glykan-Strukturen. Aufgeführt sind die verwendeten Abkürzungen der schematisch dargestellten Strukturen sowie die Massen der Natrium-Addukte. N. b. steht für nicht bestimmt.

- N-Acetylglukosamin
- Mannose
- Galaktose
- Fucose

Als Standard N-Glykane wurden entweder asialo Fetuin und seine enzymatischen Zwischenstrukturen, oder kommerziell erhältliche N-Glykane verwendet. Die entsprechenden NP-HPLC-Elugramme sind im Anhang aufgeführt. In Tabelle 11 sind die Standardstrukturen mit ihren Glukoseeinheiten angegeben.

Standard	Glukoseeinheiten
M3	5,2
A2G0	7,0
A2G0FB	7,7
A3G0	7,5
A4G0	8,2
A2G2	8,5
A3G3	9,7

Tab. 11: Standard N-Glykane.

A2G0FB und A4G0 sind kommerzielle Standards, M3, A2G0, A3G0, A2G2 und A3G3 gehen auf asialo Fetuin und seine enzymatisch hergestellten Zwischenstufen zurück.

Analysiert wurden sowohl die N-Glykane von BSP aus humanen Knochen als auch die der rekombinanten BSPs aus den verschiedenen humanen Zell-Linien. Die Daten für die BSP N-Glykane aus der Osteosarkomzell-Linie MHH-ES1 und der Mammarkarzinomzell-Linie MCF-7 waren aufgrund der schwachen Signale nicht auswertbar. Der Grund hierfür lag vermutlich in der zu geringen Protein- und damit Kohlenhydratmenge, die für die Analyse zur Verfügung stand. Aufgründdessen sind hier nur Ergebnisse für rekombinantes BSP aus der Nierenzell-Linie EBNA-293 und für BSP aus Knochen dargestellt.

Die BSP N-Glykane konnten durch sequenziellen enzymatischen Verdau mit terminalen Glykosidasen auf die allen N-Glykanen gemeinsame Pentasaccharid Grundstruktur (M3) reduziert werden, welche mit 5,2 Glukoseeinheiten dem Standard entspricht (Peak 1) (s. Abb. 17, Tab. 12). Zusätzlich ist in allen BSP N-Glykanen eine core Fukose in α 1,6-Stellung vorhanden (M3F), die zu einer Erhöhung der Glukoseeinheiten um 0,4 bis 0,5 gegenüber den nicht core fukosylierten Standards führt und im Elugramm anhand der mittels Fukosidase hervorgerufenen Größenveränderung von Peak 2 nach Peak 1 zu erkennen ist. So hat beispielsweise der Standard A3G3 9,7 Glukoseeinheiten, während die gleiche, aber core fukosylierte Struktur im BSP A3G3F 10,1 GE aufweist. Zusätzlich treten beim BSP GlcNAc β 1,4-geteilte N-Glykane auf, die über den A2G0FB-Standard bei 7,7 GE sowie über

die massenspektrometrische Analyse (s. Tab. 10) identifiziert wurden. Das zusätzliche N-Acetylglukosamin an der zentralen Mannose der core-Struktur führt zu einer Erhöhung der GE um 0,2 bis 0,3 im Vergleich zu nicht GlcNAc β 1,4-geteilten Strukturen gleicher Größe (z. B. A3G3F= 10,1 GE, A3G3FB= 10,3 GE). Diese GlcNAc β 1,4-geteilten Strukturen werden auf der NP-HPLC-Säule häufig als ein breiter Peak (z. B. 5 und 6) oder als Doppelpeak (z. B. 10 und 11) eluiert (s. Abb. 17, Tab. 12).

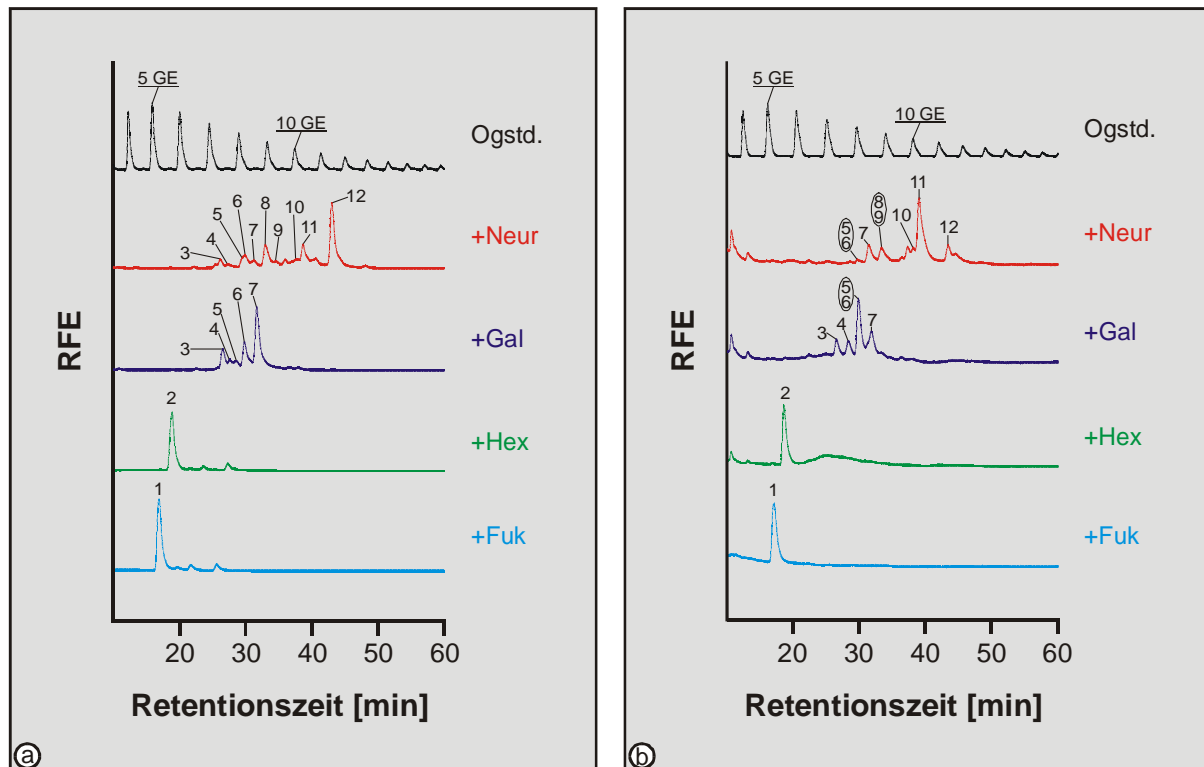


Abb. 17: Asialo BSP N-Glykane.

Überlagerung der NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogstd.) und der 2-AB markierten EBNA-293 BSP N-Glykane (a) und Knochen BSP N-Glykane (b) nach Verdau mit Neuraminidase (**Neur**), β -Galaktosidase (**Gal**), β -N-Acetylhexosaminidase (**Hex**) und α -Fukosidase (**Fuk**). Hinzufügung einer terminalen Glykosidase verlangt die Existenz der vorhergehenden Glykosidasen in jedem Reaktionsansatz. Auf der Abszissenachse ist die Retentionszeit in Minuten angegeben, die Ordinate repräsentiert die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE). Die Hauptpeaks sind durchnummeriert und in Tabelle 12 mit ihren Glukoseeinheiten und den zugeordneten Strukturen aufgelistet.

Peak Nummer	EBNA-293	BSP	Knochen	BSP	Struktur
	GE	%	GE	%	
1	5,2	0	5,2	0	M3
2	5,7	0	5,6	0	M3F
3	7,4	5	7,3	0	A2G0F
4	7,7	3	7,7	0	A2G0FB
5	8,0	ein Peak 10	ein Peak	1	A3G0F
6	8,2		8,0		A3G0FB
7	8,5	4	8,5	12	A4G0F
8	9,0	15	ein Peak 9,0	11	A2G2F
9	9,3	2			A2G2FB
10	10,1	2	10,1	6	A3G3F
11	10,3	10	10,3	51	A3G3FB
12	11,4	44	11,4	8	A4G4F

Tab. 12: EBNA-293 BSP und Knochen BSP asialo N-Glykane im Vergleich.

Aufgelistet sind die Peaknummern der NP-HPLC-Profile aus Abbildung 17, die Glukoseeinheiten (GE), die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile an den gesamten N-Glykanen (%) sowie die anhand der Standards zugeordneten Strukturen

Beim Vergleich der asialo N-Glykane von EBNA-293 BSP und BSP aus Knochen (s. Abb. 17) ist zu erkennen, dass mit Ausnahme von Peak 3 und 4, die bei dem Knochenmaterial erst nach Galaktosidase Verdau auftreten, alle Strukturen auf beiden Proteinen zu finden sind. Unterschiede gibt es hauptsächlich in dem jeweiligen Anteil der Strukturen an den gesamten N-Glykanen (s. Tab. 12). Während in den EBNA-293-Zellen der Hauptanteil der BSP N-Glykane mit 48% aus tetraantennären Strukturen besteht (Peak 7 und 12), machen biantennäre Strukturen 25% und triantennäre Strukturen 22% aus. Dahingegen bestehen die BSP N-Glykane im Knochen mit 58% aus triantennären Strukturen (Peak 5, 6, 10, 11), gefolgt von tetraantennären Strukturen mit 20% und biantennären Strukturen mit insgesamt 11%. Bei den EBNA-293 N-Glykanen konnten insgesamt 95% der Peaks zugeordnet werden, bei den Knochen BSP N-Glykanen wurden die Strukturen von 89% der Peaks ermittelt.

Bei der Analyse der N-Acetylneuraminsäurehaltigen Strukturen auf der HPLC-Anionenaustauschersäule (Q HyperD10) wurden Gruppen von N-Glykanen mit einer, zwei, drei und

vier N-Acetylneuraminsäuren anhand von Standards identifiziert (s. Abb. 18). Die entsprechenden Standardprofile sind im Anhang aufgeführt.

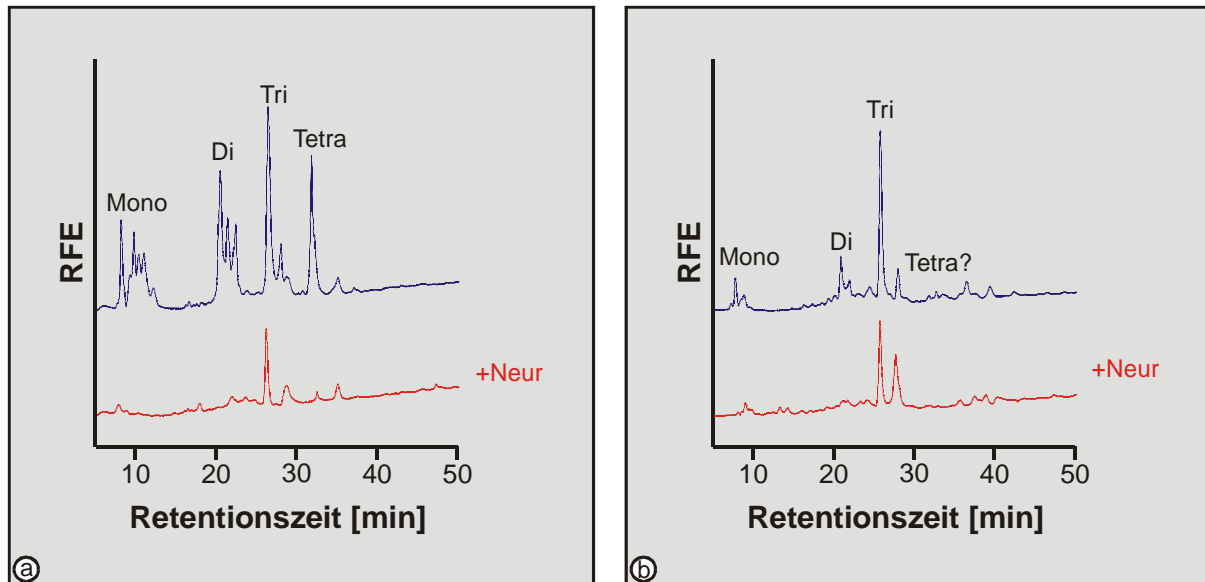


Abb. 18: Sialo BSP N-Glykane.

Anionenaustauscher-HPLC-Profile von EBNA-293 BSP (a) und Knochen BSP (b) N-Glykanen vor und nach Abspaltung der N-Acetylneuraminsäuren mit Neuraminidase (+Neur). Auf der Abszissenachse ist die Retentionszeit in Minuten angegeben, die Ordinate repräsentiert die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE). Die Gruppen von N-Acetylneuraminsäurehaltigen N-Glykanen sind je nach Anzahl mit Mono, Di, Tri und Tetra bezeichnet.

Beim Vergleich der sialinierten N-Glykane von EBNA-293 BSP und Knochen BSP (s. Abb. 18) ist zu erkennen, dass mono-, di-, tri- und tetrasialinierte Strukturen bei beiden Proteinen zu finden sind, wobei der jeweilige Anteil an den Gesamtstrukturen unterschiedlich ist. So sind beim EBNA-293 BSP Strukturen mit einer, zwei, drei und vier N-Acetylneuraminsäuren mit einem relativ gleichmäßigen Anteil von jeweils ca. 20-30% vorhanden, während beim Knochenmaterial Trisialostrukturen mit einem Anteil von 52% vorherrschend sind (s. Tab. 13).

Zusammenfassend lassen sich aus der Analyse der asialo und sialo BSP N-Glykane folgende Aussagen treffen: Es handelt sich beim BSP um N-Glykane vom Komplex-Typ mit zwei bis vier Antennen, die jeweils eine bis vier N-Acetylneuraminsäuren tragen können. Alle BSP N-Glykane sind core fukosyliert und bi- und triantennäre Strukturen kommen zusätzlich als GlcNAc β 1,4-geteilte N-Glykane vor. Die Kombination dieser Strukturen erklärt die hohe

Vielfalt des BSP N-Glykosylierungsmusters. Alle identifizierten Strukturen sind sowohl bei N-Glykanen von Knochen BSP als auch bei N-Glykanen des rekombinanten BSPs aus der Nierenzell-Linie EBNA-293 zu finden. Deutliche Unterschiede zwischen den N-Glykanen beider Proteine treten im prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen an den gesamten N-Glykanen auf.

Gruppen N-Acetylneuraminsäurehaltiger Strukturen	EBNA-293 BSP % Peakfläche	Knochen BSP % Peakfläche
Monosialo	30	13
Disialo	21	15
Trisialo	28	52
Tetrasialo	18	6
Andere	3	14

Tab. 13: Vergleich der N-Acetylneuraminsäurehaltigen Strukturen von EBNA-293 BSP und Knochen BSP.

Aufgelistet sind die aus den jeweiligen Peakflächen (s. Abb. 18) berechneten prozentualen Anteile der Gruppen N-Acetylneuraminsäurehaltiger Strukturen an den gesamten N-Glykanen.

4.3.5.2 O-Glykane

O-Glykane wurden mittels wasserfreier Hydrazinolyse vom BSP abgespalten, mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid markiert und auf einer Normalphasen-HPLC-Säule aufgetrennt. Die unterschiedlichen Strukturen (s. Abb. 19) wurden sowohl durch Vergleich der HPLC-Peaks mit Standard O-Glykanen, wie z. B. von Glykophorin A oder Mucin 1, als auch durch Verdaus einzelner Peaks mit spezifischen Glykosidasen bestimmt. Der jeweilige prozentuale Anteil der Strukturen wurde ausgehend von den Peakflächen berechnet. Die entsprechenden Massen wurden mittels Methylierungsanalyse und MALDI-TOF-Massenspektrometrie erhalten (s. Tab. 14).

Des Weiteren wurden die O-Glykane von BSP aus humanen Knochen und die der rekombinanten BSPs aus verschiedenen Zell-Linien miteinander verglichen. Die NP-HPLC-Profile der BSP O-Glykane aus der Osteosarkomzell-Linie MHH-ES1 und der Mammakarzinomzell-Linie MCF-7 waren, wie schon bei den N-Glykanen, aufgrund zu geringer

Probenmengen nicht aussagekräftig. Deshalb ist hier nur die Analyse der O-Glykane von rekombinantem EBNA-293 BSP und BSP aus Knochen aufgeführt.

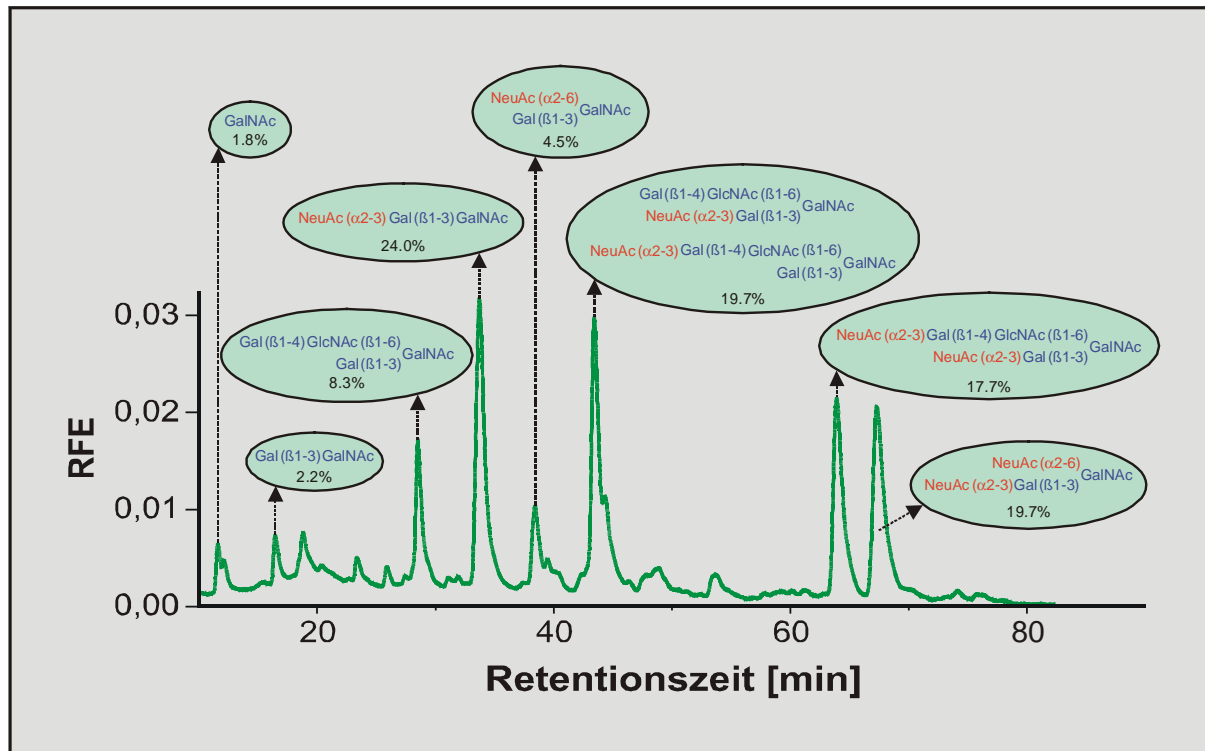


Abb. 19: NP-HPLC-Profil der BSP O-Glykane aus EBNA-293 Zellen.

Auf der Abszissenachse ist die Retentionszeit in Minuten aufgeführt, die Ordinatenachse repräsentiert die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE).

Beim Vergleich der O-Glykane von BSP aus Knochen und rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen ergaben sich teilweise übereinstimmende Strukturen (s. Abb. 20, Tab. 14). So waren Strukturen, die sich von *core1* ableiten, wie Peak 2, 4, 5 und 8, in beiden Präparationen zu sehen. Andererseits waren Strukturen, die auf *core2* aufbauen, wie Peak 3, 6 und 7, auf dem aus Knochen isolierten BSP nicht vorhanden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Osteoblasten nicht in der Lage sind, *core2* zu synthetisieren, was mit fehlender *core2*-β1,6 N-Acetylglukosaminyltransferaseaktivität erklärt werden könnte.

Unterschiede gab es auch in dem prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen (s. Tab. 14). So bestand der Hauptanteil der O-Glykane des Knochen BSPs mit 66% aus Peak 8, einer disialinisierten *core1*-Struktur. Bei den O-Glykanen des rekombinanten BSPs aus EBNA-293 Zellen verteilten sich die Hauptstrukturen mit jeweils ca. 20% auf Peaks 4, 6, 7 und 8.

Fukosylierte Strukturen sind in der HPLC-Analyse nicht gefunden worden und die Methylierungsanalyse bestätigte die Abwesenheit von 2-fukosylierten Glykanen.

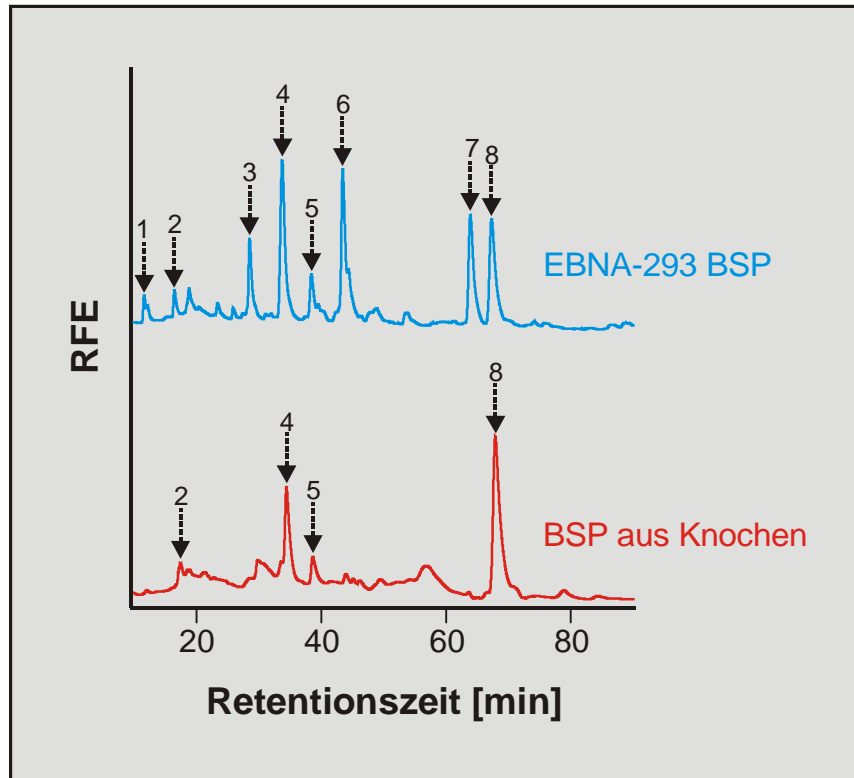


Abb. 20: Vergleichende NP-HPLC-Analyse der O-Glykane.

Oben ist das Elugramm von O-Glykanen des BSPs aus EBNA-293 Zellen dargestellt, darunter das der O-Glykane des Knochen BSPs. Auf der Abszissenachse ist die Retentionszeit in Minuten aufgeführt, die Ordinatenachse repräsentiert die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE). Die Hauptpeaks sind durchnummeriert und in Tabelle 14 den entsprechenden Strukturen zugeordnet.

Peak	Struktur	Prozentualer Anteil		Masse der permethylierten Glykane
		EBNA-293 BSP	Knochen BSP	
1	GalNAc	2%	0%	n. b.
2	Gal(β1-3)GalNAc	2%	5%	518
3	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-3)GalNAc	8%	0%	967
4	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	24%	21%	879
5	NeuAc(α2-6) Gal(β1-3)GalNAc	5%	7%	n. b.
6	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) Gal(β1-3)GalNAc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	20%	0%	1328
7	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	18%	0%	1689
8	NeuAc(α2-6) NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	20%	66%	1240

Tab. 14: Vergleichende Analyse der BSP O-Glykane.

Die in der NP-HPLC erhaltenen Peaks (s. Abb. 20) sind jeweils mit ihrer Struktur, dem prozentualen Anteil an den gesamten O-Glykanen und der in der Methylierungsanalyse ermittelten Masse aufgeführt. N. b. steht für nicht bestimmt.

Um die O-Glykosylierungsstellen des rekombinanten BSPs zu bestimmen, wurden die O-Glykane des Proteins bis auf das core-GalNAc durch sequenziellen Verdau mit verschiedenen Glykosidasen abgespalten. Anschließend wurde das partiell deglykosylierte Protein durch Zugabe von Proteasen in Peptidfragmente gespalten, deren Massen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt wurden und deren Sequenzen zum Teil mittels PSD-MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt werden konnten (s. Tab. 15).

Relative Massen (gemessen)	Relative Massen (berechnet)	Peptid (+Glykosylierung)	PSD-Sequenz
591,2	590,7	23-27	
842,3	842,4	288-294	
1175,4	1175,6	82-90	vorhanden
1351,6	1352,5	28-40	
1675,8	1676,8	41-54	
1902,1	1902,9	336-351	vorhanden
1923,8	1924,2	23-40	
2254,3	2254,4	261-279 (+ 1 GalNAc)	
2457,2	2457,6	261-279 (+ 2 GalNAc)	
2460,2	2460,7	1-22	
2661,1	2660,8	261-279 (+ 3 GalNAc)	vorhanden
2864,3	2864,0	261-279 (+ 4 GalNAc)	vorhanden
3033,5	3032,4	151-180	
3065,7	3067,2	261-279 (+ 5 GalNAc)	
3440,4	3438,8	151-180 (+ 2 GalNAc)	
3643,5	3642,0	151-180 (+ 3 GalNAc)	

Tab. 15: Bestimmung der BSP-O-Glykosylierungsstellen.

Die O-Glykane des rekombinanten his₆-myc-EK-BSPs aus EBNA-293 Zellen wurden sequenziell mit Neuraminidase, β -Galaktosidase und β -N-Acetylhexosaminidase bis auf das *core*-GalNAc entfernt, wonach das Protein durch Zugabe von Trypsin und V8-Protease in Peptidfragmente gespalten wurde. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden die Massen der Peptide bestimmt und ein Teil der Peptide konnte mittels PSD- MALDI-TOF-Massenspektrometrie sequenziert werden.

Obwohl die nach proteolytischem Verdau erhaltenen Peptidfragmente nicht die komplette BSP-Sequenz repräsentierten, konnten mit dieser Methode acht O-Glykosylierungsstellen des rekombinanten BSPs bestimmt werden, maximal fünf auf Peptid 261-279 und maximal drei auf Peptid 151-180. Dass diese Stellen nicht immer vollständig glykosyliert sind, ist daran zu erkennen, dass gleiche Peptide mit unterschiedlicher Anzahl gebundener GalNAc-Reste gefunden wurden (z. B. Peptid 261-279 mit 1-5 GalNAc-Resten). Dies deutet auf die in vielen Glykoproteinen vorhandene Mikroheterogenität hin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Peptide aus dem C-terminalen Bereich des BSPs (288-294 und 336-251) nicht glykosyliert sind.

4.3.5.3 Chondroitinsulfate und Phosphate

Um die Anwesenheit von Chondroitinsulfatketten auf rekombinatem BSP zu untersuchen, wurde das Protein mit Chondroitinase ABC, einem Enzym, das Chondroitinsulfat- und Dermatan-sulfatketten von Proteoglykanen hydrolysiert, verdaut. Die Spaltprodukte wurden mittels Immunoblot analysiert.

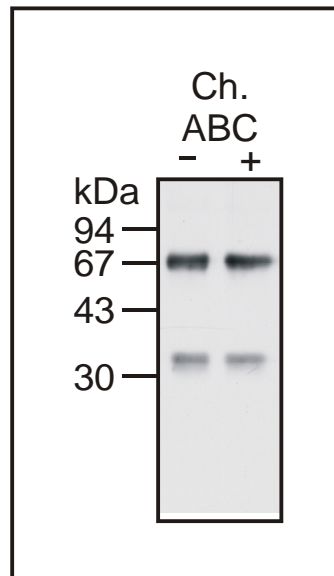


Abb. 21: Chondroitinase ABC-Verdau von rekombinatem BSP.

300 ng rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen wurde mit Chondroitinase ABC (Ch. ABC) (+) verdaut, auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit einem polyklonalen BSP-Antikörper im Immunoblot detektiert. Die Negativkontrolle (-) bestand aus dem gleichen Ansatz ohne Enzym. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind links von dem Gel in kDa angegeben.

Da nach Chondroitinase-Behandlung keine Größenveränderung im Gel zu erkennen war (s. Abb. 21), kann man davon ausgehen, dass das rekombinante BSP keine Chondroitinsulfatketten trägt. Die Vermutung, dass die Banden bei ca. 35 kDa durch Kontaminationen des Enzyms mit Proteasen entstanden sind, ist aufgrund ihrer Anwesenheit in der Negativkontrolle widerlegt worden.

Um die Anwesenheit von Phosphaten auf den Aminosäuren Serin und Threonin des rekombinanten BSPs zu überprüfen, wurde das Protein mit Protein Phosphatase 1, einem Enzym, das den Hauptanteil an Serin/Threonin Phosphatasen in Eukaryoten ausmacht, verdaut. Die Analyse der Spaltprodukte im Immunoblot ergab jedoch keine Größen-

veränderung. Daraufhin wurde versucht, das rekombinante BSP im Immunoblot mit einem Phosphotyrosin-Antikörper (PY20) zu detektieren. Auch hier konnte kein Signal erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Dass phosphorylierte Strukturen des BSPs mit diesen beiden Methoden nicht erfasst werden konnten, kann darauf zurückzuführen sein, dass sie entweder nicht vorhanden sind oder dass die Phosphatreste durch andere posttranslational hinzugefügte Strukturen, wie z. B. die Glykane, für das verwendete Enzym bzw. den Antikörper nicht zugänglich sind.

4.3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Rekombinantes BSP aus EBNA-293-Zellen wurde nach Rotationsbedampfung oder Negativkontrastierung unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop vergrößert und fotografiert (s. Abb. 22).

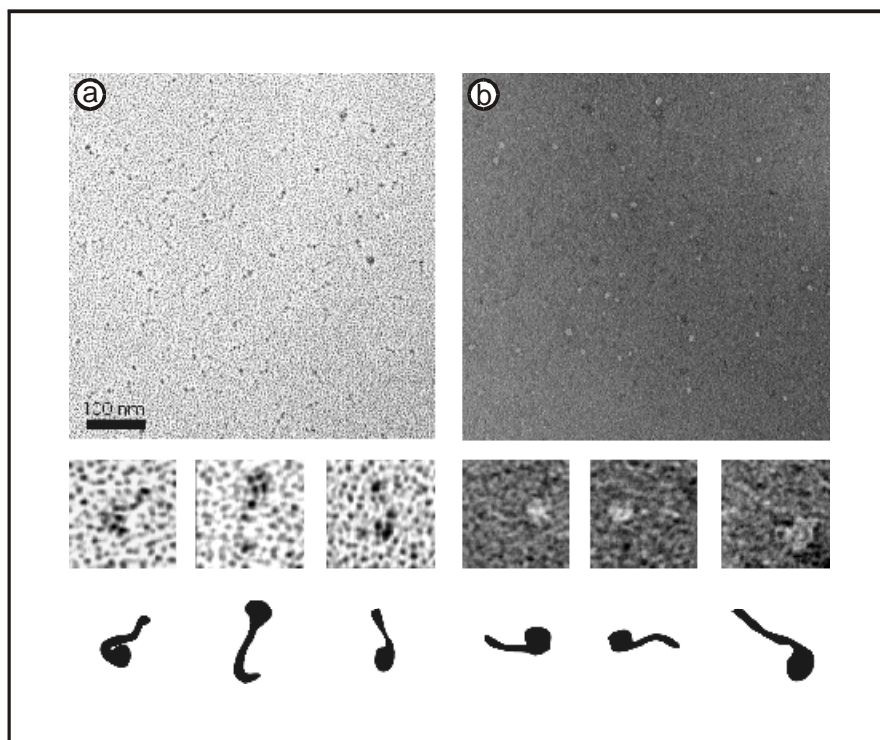


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen.

Rekombinantes his₆-myc-BSP aus EBNA-293-Zellen wurde nach Rotationsbedampfung (a) und BSP ohne Fusionspeptidsequenz wurde nach Negativkontrastierung (b) unter dem Elektronenmikroskop fotografiert. Die oberen Abbildungen zeigen eine Übersicht eines repräsentativen Ausschnitts, der Balken entspricht 100 nm. Darunter sind einzelne BSP-Moleküle vier-fach vergrößert abgebildet, deren Strukturen ganz unten zur Verdeutlichung von Hand nachgezeichnet wurden.

Die Aufnahmen zeigen Monomere, die aus einer globulären Struktur mit einem Durchmesser von 10 +/- 1 nm bestehen, welche mit einer elongierten Struktur von 25 +/- 6 nm Länge verbunden ist. Bei der globulären Struktur handelt es sich vermutlich um das C-terminale Ende von BSP, das frei von Glykanen ist (s. Tab.15, Abb. 37). Die elongierte Struktur, die nach Rotationsbedampfung besser zu erkennen ist, entspräche demnach dem stark glykosylierten restlichen Anteil des Proteins bis zum N-Terminus. Zwischen dem his₆-myc-BSP und dem BSP ohne Fusionspeptidsequenz waren keine strukturellen Unterschiede im Elektronenmikroskop zu erkennen.

4.4 Funktionelle Charakterisierung

Da BSP sowohl im Knochen als auch in verschiedenen Tumoren und Knochenmetastasen exprimiert wird, die genauen Funktionen des Proteins aber noch unbekannt sind, wurden Experimente, die zur funktionellen Charakterisierung des Moleküls beitrugen, durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich Fragen über funktionelle Zusammenhänge im Knochen und über Eigenschaften von Mammakarzinomzell-Linien beantwortet.

4.4.1 Potenzielle Funktionen im Knochen

Um die Funktionen von BSP im Knochen näher beschreiben zu können, wurde die Bindung von BSP an Collagene, die Lokalisation des Proteins in einer in vitro Knochenmatrix und die Affinität für Hydroxylapatit untersucht.

4.4.1.1 Bindung an Collagene

1992 wurde zum ersten Mal gezeigt (Fujisawa et al., 1992), dass unter denaturierenden Bedingungen aus bovinen Knochen isoliertes BSP an Collagen I-Fibrillen bindet. Diese Bindung wurde später hauptsächlich auf die $\alpha 2$ Kette lokalisiert und war nach Neuraminidase-Behandlung verstärkt (Fujisawa et al., 1995). Um festzustellen, ob das native rekombinant hergestellte BSP auch an Collagen I bindet, wurde ein Collagen I-BSP-Bindungsassay in Form eines ELISAs in einer Mikrotiterplatte etabliert. Nachdem die optimale Ligandenkonzentration, die Antikörperverdünnung und das geeignete Blockierungsgreagenz gefunden waren, wurde der Assay unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Zuerst wurde das Collagen in saurem Milieu, in hitzedenaturierter Form und als Collagen-

Fibrillen auf die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Bildung der Collagen I-Fibrillen wurde zuvor mittels Trübungsmessungen bei 350 nm im Fotometer verfolgt (s. Abb. 23). Nach Absättigung der verbliebenen Plastikbindungsstellen mit 1% Casein wurde rekombinantes BSP [10 µg/ml] als Ligand hinzugegeben und die Bindung mit Hilfe des monoklonalen BSP Antikörpers in Form eines ELISAs untersucht. Als Positivkontrolle wurde rekombinant hergestelltes COMP eingesetzt, weil dessen Bindung an Collagen I in dieser Art von Assay bereits gezeigt worden ist (Thur et al., 2000).

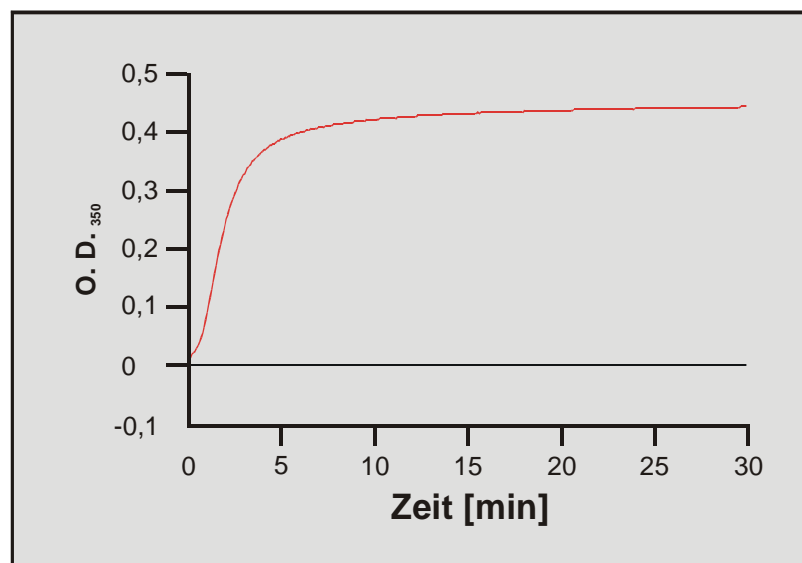


Abb. 23: Fibrillogenese von Collagen I.

Aus boviner Haut isoliertes Collagen I wurde in der Endkonzentration von 0,5 mg/ml in eine auf 37°C temperierte Küvette gegeben, in der mit HEPES Puffer der pH-Wert von 2,0 auf 7,4 erhöht wurde. Unmittelbar nach Collagenzugabe wurde die durch Fibrillogenese verursachte Trübung in einem Spektrofotometer über einen Zeitraum von 30 min bei 37°C und einer Wellenlänge von 350 nm verfolgt. Die Linie parallel zur Abszisse zeigt das Pufferspektrum.

Die Fibrillogenese von Collagen I setzte unmittelbar nach Einstellung des pH-Werts der Collagenlösung auf 7,5 ein und erreichte nach 10 min einen Sättigungswert (s. Abb. 23).

Mit dem Collagen I-BSP-Bindungsassay konnte keine signifikante Bindung von rekombinatem BSP an die verschiedenen Formen von Collagen I nachgewiesen werden (s. Abb. 24). Auch die Zugabe von 5 mM CaCl_2 oder 0,5 mM ZnCl_2 führte zu keinem Unterschied in der Affinität. Die Positivkontrolle mit rekombinatem COMP bestätigte die Funktion des Assaysystems.

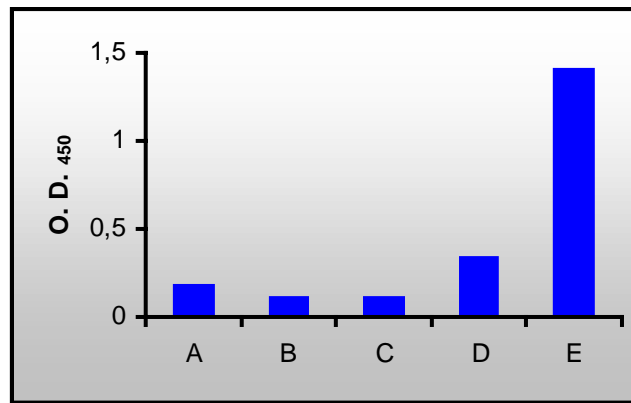


Abb. 24: Collagen I-BSP-Bindungsassay.

Nach Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit Collagen I in verschiedenen Formen und Konzentrationen (20 µg/ml in 1% Essigsäure (A), 500 µg/ml hitzedenaturiert in 1% Essigsäure (B), 500 µg/ml Fibrillen in HEPES-Puffer, pH 7,4, (C)), wurde rekombinantes BSP in Lösung hinzugegeben und der gebundene Anteil des Proteins mit dem monoklonalen BSP-Antikörper, einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper und einer anschließenden Farbreaktion detektiert. Als Negativkontrolle wurde das Plastik unbeschichtet verwendet (D) und als Positivkontrolle wurde die Platte mit rekombinantem BSP in einer Konzentration von 1 µg/ml beschichtet (E).

Zusätzlich wurden mittels Cyanogenbromid gespaltene Collagen I und Collagen II-Fragmente in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit rekombinantem BSP als Ligand inkubiert. Auch hier konnte mit Hilfe des monoklonalen BSP-Antikörpers keine Bindung an die Collagenfragmente gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.1.2 In vitro Modell für die mineralisierte Knochenmatrix

Um die Lokalisation von BSP und seinen potenziellen Bindungspartnern im Knochen näher bestimmen zu können, wurde ein in vitro Modell für die mineralisierte Knochenmatrix etabliert. Dazu wurde die humane Osteosarkomzell-Linie SAOS-2 bzw. die Ratten Osteosarkomzell-Linie UMR-108 postkonfluent für zwei Wochen unter täglichem Mediumwechsel kultiviert. Um die Entwicklung einer mineralisierten extrazellulären Matrix zu unterstützen, wurde das Medium mit 0,25 mM Ascorbinsäure und mit 10 mM β-Glycerophosphat supplementiert. Unter diesen Bedingungen waren die Hauptbestandteile des Hydroxylapatits, Calcium und Phosphat, sowohl innerhalb der Zellen als auch in der extrazellulären Matrix im Vergleich zu unter normalen Mediumbedingungen kultivierten Zellen erhöht (s. Abb. 25, Abb. 26).

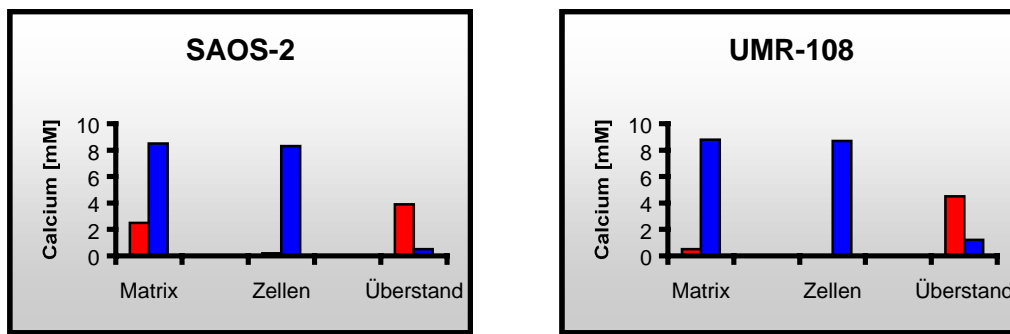


Abb. 25: Calciumbestimmung.

Mit Hilfe eines kolorimetrischen Nachweises, der auf Bildung eines roten Calcium-Arsenazo-III-Komplexes beruht (Sigma-Kit), wurde anhand einer mit CaCl_2 erstellten Standardkurve der Calciumgehalt der extrazellulären Matrix, der Zell-Lysate und des Zellkulturüberstands von 14 Tage postkonfluent kultivierten SAOS-2 und UMR-108 Zellen ermittelt. Verglichen wurden die mit β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure supplementierten Zellen (blaue Balken) mit unter normalen Mediumbedingungen kultivierten Zellen (rote Balken).

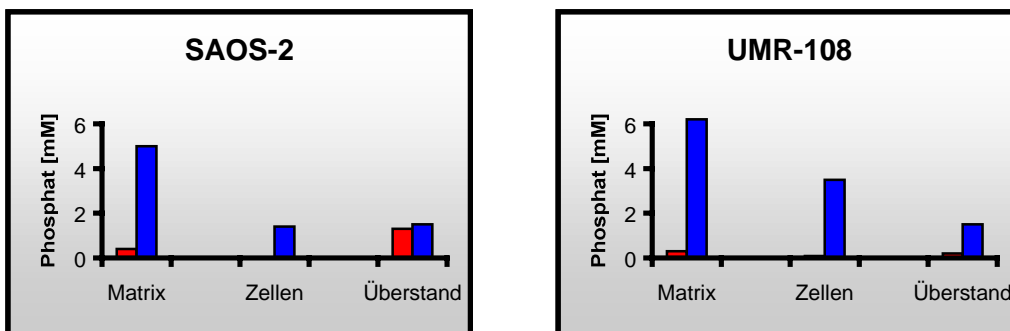


Abb. 26: Phosphatbestimmung.

Mit Hilfe eines kolorimetrischen Nachweises, der auf Bildung eines blauen Phosphomolybdänkomplexes beruht (Sigma-Kit), wurde anhand einer mit anorganischem Phosphat erstellten Standardkurve der Phosphatgehalt der extrazellulären Matrix, der Zell-Lysate und des Zellkulturüberstands von 14 Tage postkonfluent kultivierten SAOS-2 und UMR-108 Zellen ermittelt. Verglichen wurden die mit β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure supplementierten Zellen (blaue Balken) mit unter normalen Mediumbedingungen kultivierten Zellen (rote Balken).

Ein Vergleich mit den Daten der Calcium und Phosphatbestimmung, die nach drei Wochen durchgeführt wurde, ergab keine signifikanten Unterschiede. Die nach einer Woche ermittelten Werte lagen teilweise unterhalb der nach zwei Wochen gemessenen Konzen-

trationen. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt nach zwei Wochen für die folgenden Immunfluoreszenzuntersuchungen gewählt.

4.4.1.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von BSP, Fibronectin und Collagen I

Um BSP und potenzielle Bindungspartner in diesem Zellkultursystem detektieren zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von 14 Tage postkonfluent kultivierten Osteosarkomzell-Linien durchgeführt. Dabei wurden zunächst zwei Proteine der extrazellulären Matrix des Knochens, Collagen I und Fibronectin, angefärbt.

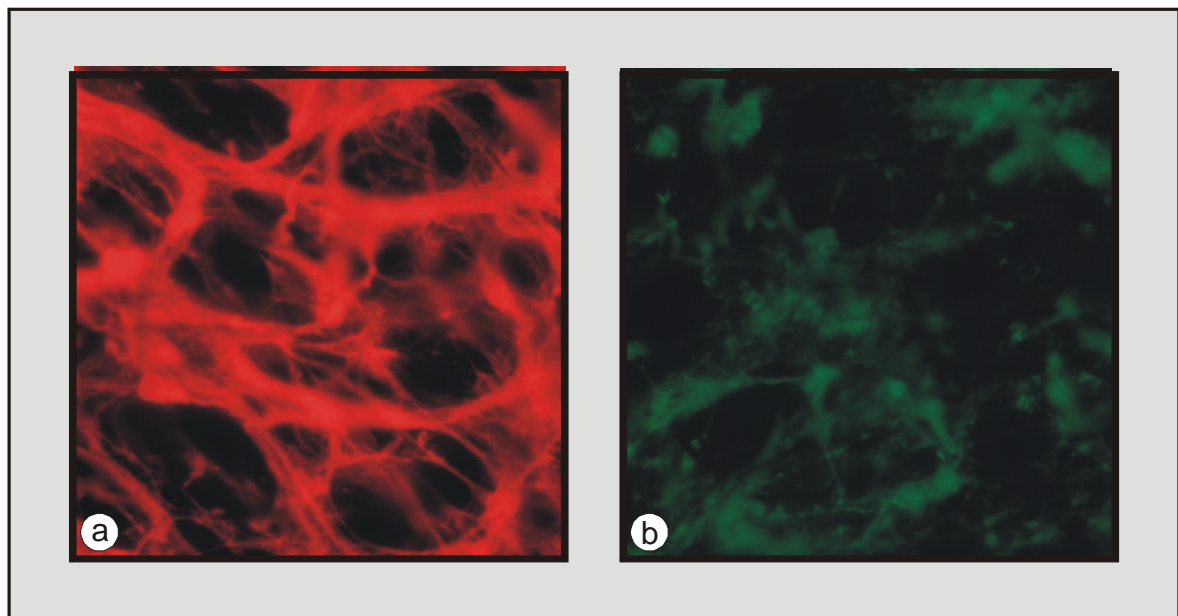


Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung von Collagen I und Fibronectin.

SAOS-2 Zellen, die zwei Wochen postkonfluent unter Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure kultiviert wurden, wurden nach Fixierung mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Collagen I (a) oder mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Fibronectin (b) inkubiert, welche mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweitantikörpern detektiert wurden. Die Abbildungen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Von den SAOS-2 Zellen wurde ein ausgeprägtes Netzwerk aus Collagen I und ein Fibronectin-Netzwerk ausgebildet (s. Abb. 27). Dies war sowohl unter normalen als auch unter supplementierten Mediumbedingungen der Fall und geschah somit unabhängig von der Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure. Immunfluoreszenzfärbungen von

UMR-108 Zellen waren aufgrund der durch den Zweitantikörper verursachten Hintergrundfärbung und wegen der starken Konfluenz der Zellen in dieser Form nicht auswertbar.

BSP war sowohl unter normalen als auch unter supplementierten Mediumbedingungen innerhalb der Zellen detektierbar, konnte aber in der extrazellulären Matrix nicht gefunden werden (s. Abb. 28).

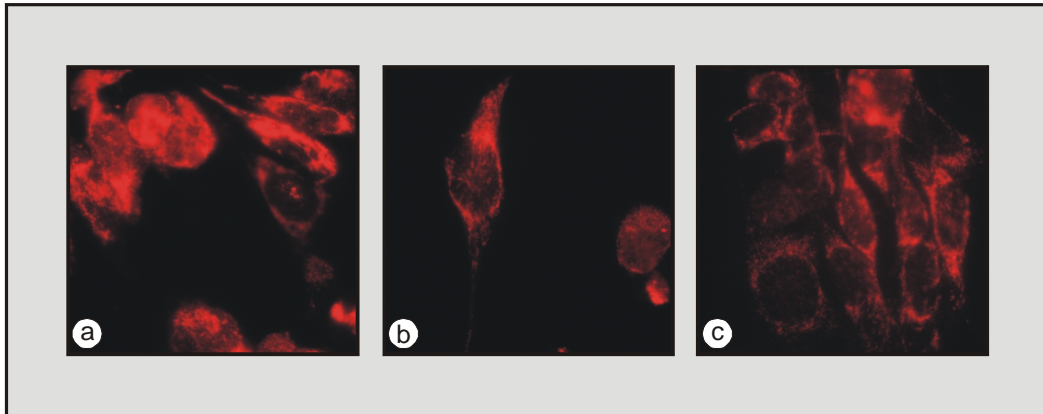


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbung von BSP.

Zwei Wochen postkonfluent kultivierte SAOS-2 Zellen wurden nach Permeabilisierung und Fixierung mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen BSP inkubiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweitantikörper detektiert wurde. Die Abbildungen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. In (a) sind die Zellen in Gegenwart von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure kultiviert worden, in (b) und (c) sind unter normalen Mediumbedingungen gewachsene Zellen gezeigt.

Da die Immunfluoreszenzaufnahmen keine signifikanten Unterschiede in den intrazellulären BSP-Mengen erkennen ließen, scheint die Anwesenheit von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure keinen Einfluss auf die BSP-Expressionsrate in diesem Zellkultursystem zu haben (s. Abb. 28). In Übereinstimmung mit den durchgeführten Collagen I-Bindungsassays, mit denen keine Assoziation zwischen BSP und Collagen I nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 24), war auch mit dieser Methode keine Kolo-kalisation der beiden Proteine in der extrazellulären Matrix detektierbar.

4.4.1.2.2 Extraktion von BSP aus Hydroxylapatitkristallen

Immunoblotanalysen von serumhaltigen Kulturüberständen der SAOS-2 und UMR-108 Zellen ergaben unter normalen Mediumbedingungen Signale für BSP ab der ersten postkonfluenten Woche. Überstände von Zellen, die in Gegenwart von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure kultiviert wurden, enthielten hingegen kein BSP (s. Abb. 29).

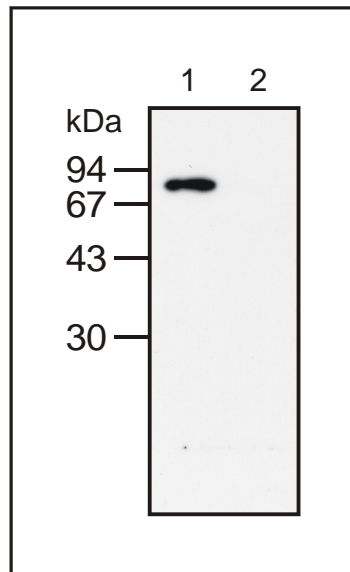


Abb. 29: BSP-Sekretion von SAOS-2 Zellen.

Die Zellen wurden für zwei Wochen postkonfluent unter täglichem Mediumwechsel in normalem Kulturmedium (1) oder unter Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure (2) kultiviert. Die Sekretion von BSP wurde mittels Immunoblotanalysen serumhaltiger Kulturüberstände unter Verwendung des monoklonalen BSP-Antikörpers untersucht. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind in kDa links von dem Gel angegeben.

Da das Protein in beiden Fällen intrazellulär mittels Immunfluoreszenz detektiert werden konnte (s. Abb. 28) und es normalerweise mit Hilfe seines Signalpeptids aus Zellen sekretiert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass BSP nach seiner Sekretion mit Hydroxylapatitkristallen in der extrazellulären Matrix assoziiert und deshalb im Überstand der mit β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure supplementierten Zellen nicht detektierbar war.

Aufgrunddessen wurde zunächst die Bildung von Hydroxylapatitkristallen mittels von Kossa Färbung fixierter Zellen untersucht.

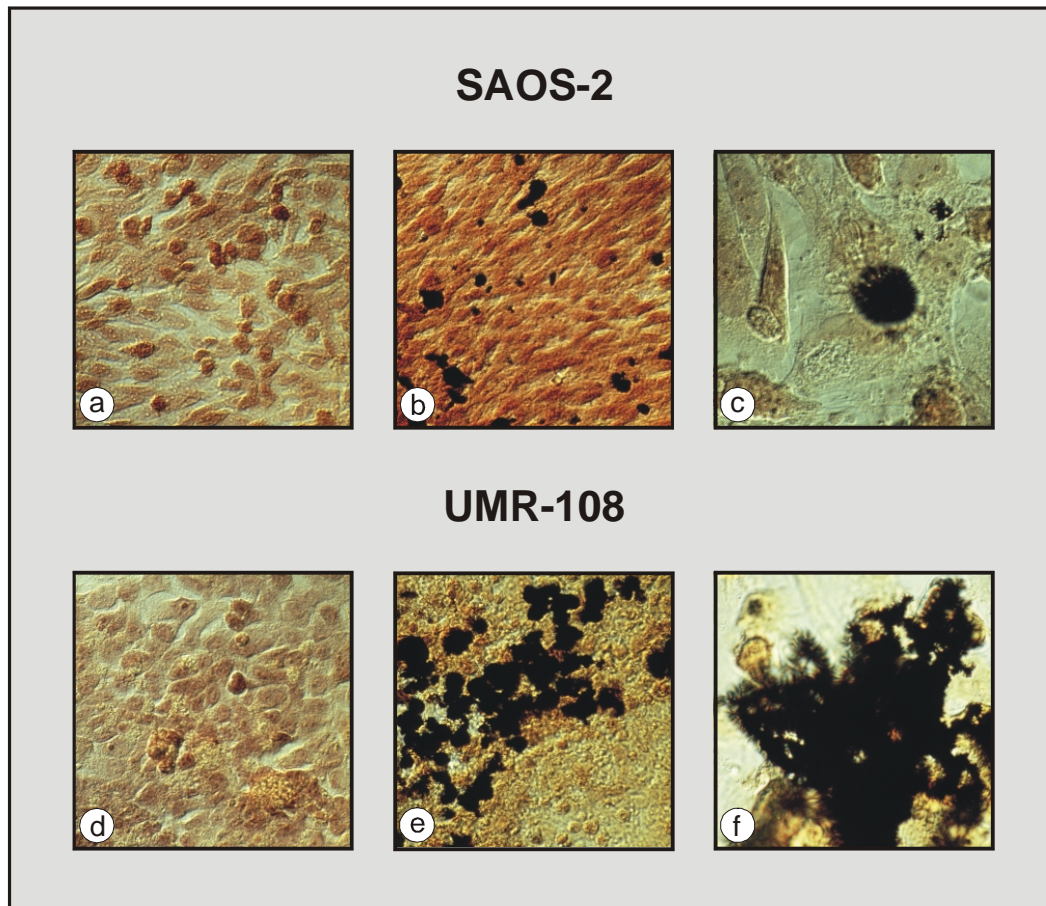


Abb. 30: Von Kossa Färbung von Hydroxylapatitkristallen.

SAOS-2 und UMR-108 Zellen wurden für zwei Wochen postkonfluent entweder unter normalen Mediumbedingungen (a, d) oder unter Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure (b, c, e, f) kultiviert. Hydroxylapatitkristalle wurden mittels von Kossa Färbung sichtbar gemacht, die Zellen wurden mit Kernechtrot angefärbt. Die Abbildungen sind 40-fach (a, b, d, e) bzw. 100-fach (c, f) vergrößert.

Die nadelähnlichen Hydroxylapatitkristalle, die als schwarze Strukturen zu erkennen sind (s. Abb. 30), konnten ausschließlich in der extrazellulären Matrix von Zellen, die in Gegenwart von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Unter normalen Mediumbedingungen wurden keine Kristalle gebildet.

Um eine Assoziation von BSP mit den gebildeten Hydroxylapatitkristallen nachweisen zu können, wurden die Zellen nach drei Wochen postkonfluenter Kultivierung in mit

β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure supplementiertem Medium sequenziell jeweils zwei Mal für 24 Stunden mit 4 M Gu-HCl, 0,5 M EDTA und nochmals 4 M Gu-HCl extrahiert. Die Extrakte wurden nach Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das BSP im Immunoblot detektiert (s. Abb. 31).

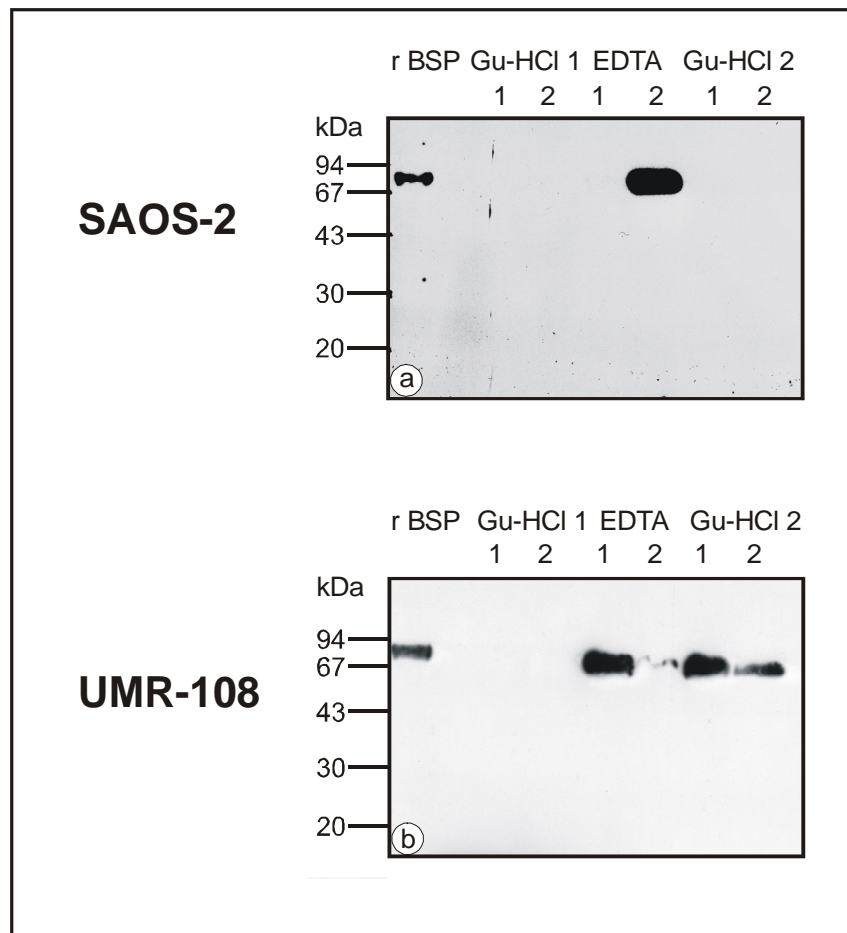


Abb. 31: Extraktion von BSP aus Hydroxylapatitkristallen.

Pro Spur wurden jeweils 2 ml der Extrakte (Gu-HCl, EDTA) nach Dialyse und TCA-Fällung auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und BSP im Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper detektiert. Zum Vergleich sind in der ersten Spur 60 ng rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen (r BSP) aufgetragen. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind links von den jeweiligen Blots in kDa angegeben.

BSP war aus den Hydroxylapatitkristallen, die ausschließlich unter supplementierten Mediumbedingungen gebildet wurden, mit EDTA extrahierbar (s. Abb. 31). Eine größere Anzahl von gebildeten Kristallen, wie bei den UMR-108 Zellen (s. Abb. 30), war einhergehend mit einer höheren BSP-Menge in den Extrakten. Somit scheint die Hypothese, dass

das im Zellkulturüberstand nicht detektierbare BSP in die Hydroxylapatitkristalle eingeschlossen wird, richtig zu sein. Diese in vitro Daten unterstützen eine funktionelle Rolle für BSP im Knochen als Nukleator für Hydroxylapatitkristalle.

4.4.1.3 Hydroxylapatitaffinität

Sowohl die Analyse der Sekundärstrukturelemente als auch die der Glykosylierungsmuster zeigte geringfügige Unterschiede zwischen rekombinantem BSP und aus Knochen isoliertem Protein. Deshalb wurde untersucht, ob diese Unterschiede Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften des Moleküls haben. Da BSP in dem in vitro Zellkulturmodell für die mineralisierte Knochenmatrix mit Hydroxylapatitkristallen assoziiert war (s. 4.4.1.2.2), wurde die Affinität zu Hydroxylapatit als funktionelles Kriterium untersucht. Dazu wurden jeweils 50 µg aus Knochen isoliertes BSP und rekombinantes Protein aus EBNA-293 Zellen und aus MCF-7 Zellen auf eine Hydroxylapatitsäule gegeben und mit einem linearen Gradienten von 10 mM bis 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2, eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Immunoblot auf ihren BSP-Gehalt getestet (s. Abb. 32).

In diesem Assay hatte BSP aus humanen Knochen die stärkste Affinität für Hydroxylapatit (s. Abb. 32). Die Fraktionen mit dem höchsten Knochen BSP-Gehalt wurden bei einer Natriumphosphatkonzentration von 295 bis 345 mM eluiert. Die zweitstärkste Bindung zeigte das BSP aus serumfreien Zellkulturüberständen der Mammakarzinomzell-Linie MCF-7, welches zwischen 263 und 293 mM Natriumphosphat eluiert wurde. Die Bindungsaffinität von BSP aus EBNA-293 Zellen, das mit einer Natriumphosphatkonzentration von 220-270 mM eluiert wurde, lag deutlich unterhalb der des Knochen-BSPs und überschchnitt sich mit der des MCF-7-BSPs im Bereich von 263-270 mM. Da die in diesem Assay eingesetzten BSPs eine identische Sequenz besitzen, sind die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen als Erklärung für die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für Hydroxylapatit anzunehmen.

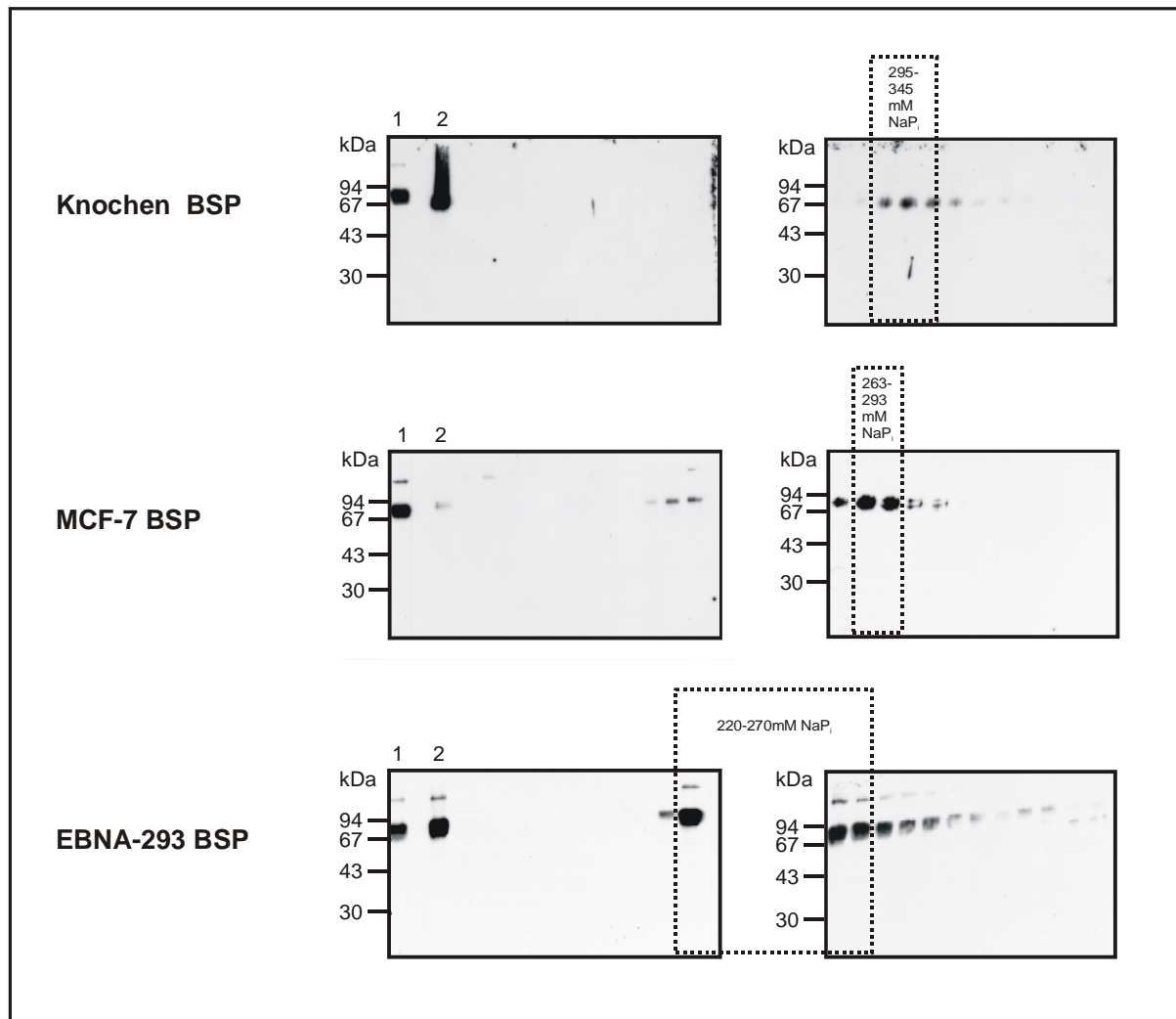


Abb. 32: Hydroxylapatitaffinität verschiedener BSPs.

Jeweils 20 µl der von einer Hydroxylapatitsäule eluierten Fraktionen wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und BSP im Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. In Spur 1 sind 50 ng rekombinantes BSP aus EBNA-293 Zellen aufgetragen, Spur 2 enthält 20 µl des Proteins, bevor es auf die Säule gegeben wurde. Jeweils links von den Blots sind die Positionen des Molekulargewichtsstandards in kDa angegeben. In den Rechtecken sind die BSP-Hauptfraktionen mit den dazugehörigen Natriumphosphatkonzentrationen hervorgehoben.

4.4.2 BSP und Brustkrebs

Eine Hypothese zur Erklärung der Funktion von BSP beim Osteotropismus des Mammakarzinoms ist, dass BSP, welches die Tumorzellen produzieren, mit seiner RGD-Sequenz über Integrin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche gebunden wird und gleichzeitig mit seinen Glutaminsäure reichen Regionen die bevorzugte Anheftung der Brustkrebszellen an das Hydroxylapatit des Knochens vermittelt (Waltregny et al., 2000).

Die Assoziation von BSP mit Hydroxylapatitkristallen in der extrazellulären Matrix wurde in Abschnitt 4.4.1.2.2 nachgewiesen und die Affinität des Proteins zu Hydroxylapatit in Abschnitt 4.4.1.3 beschrieben. Deshalb wurde vor dem Hintergrund der funktionellen Rolle von BSP beim Mammakarzinom die Expression des Proteins in und auf verschiedenen humanen Brustkrebszell-Linien sowie die Adhäsion verschiedener Brustkrebszellen an rekombinantes BSP untersucht.

4.4.2.1 BSP-Expression humaner Brustkrebszell-Linien

Vier verschiedene humane Mammakarzinomzell-Linien (MCF-7, MDA-MB-231, T47-D und ZR75-1) wurden mit unterschiedlichen immunologischen Methoden auf ihre endogene Expression und Sekretion von BSP getestet. Zunächst wurden Zell-Lysate und Zellkultur-überstände serumhaltig und serumfrei kultivierter Zellen mittels Immunoblot auf ihren BSP-Gehalt untersucht. Dabei wurden sowohl frühe als auch späte Passagen sowie unterschiedliche Kulturmedien und vier verschiedene BSP-Antikörper (monoklonaler Mausantikörper, drei verschiedene polyklonale Kaninchenantikörper: LF6, LF83, Lot 970909) verwendet. Der Grund für die Vielfalt der verwendeten Reagenzien war die gleichzeitige Überprüfung bereits publizierter Daten (Bellahcène et al., 1996 a). Mit dieser Methode konnte BSP in keiner der Zell-Linien eindeutig nachgewiesen werden. Bei MDA-MB-231 und T47-D gab es schwache Signale oberhalb von 94 kDa (Daten nicht gezeigt). Ob es sich dabei um BSP handelt, kann nicht eindeutig gesagt werden, da die Größe des in Brustkrebszellen und in Tumorgewebe exprimierten BSPs noch unbekannt ist.

Immunfluoreszenzuntersuchungen mit permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Zellen ergaben positive intrazelluläre Signale für alle vier Zell-Linien. Von den nicht-permeabilisierten Zellen war nur die T47-D eindeutig positiv (s. Abb. 33).

Um diese Ergebnisse mit einer Methode zu verifizieren, bei der die Zellen nicht fixiert vorliegen und das BSP besser zugänglich ist, wurden FACS-Messungen mit nicht-permeabilisierten Zellen durchgeführt (s. Abb. 34).

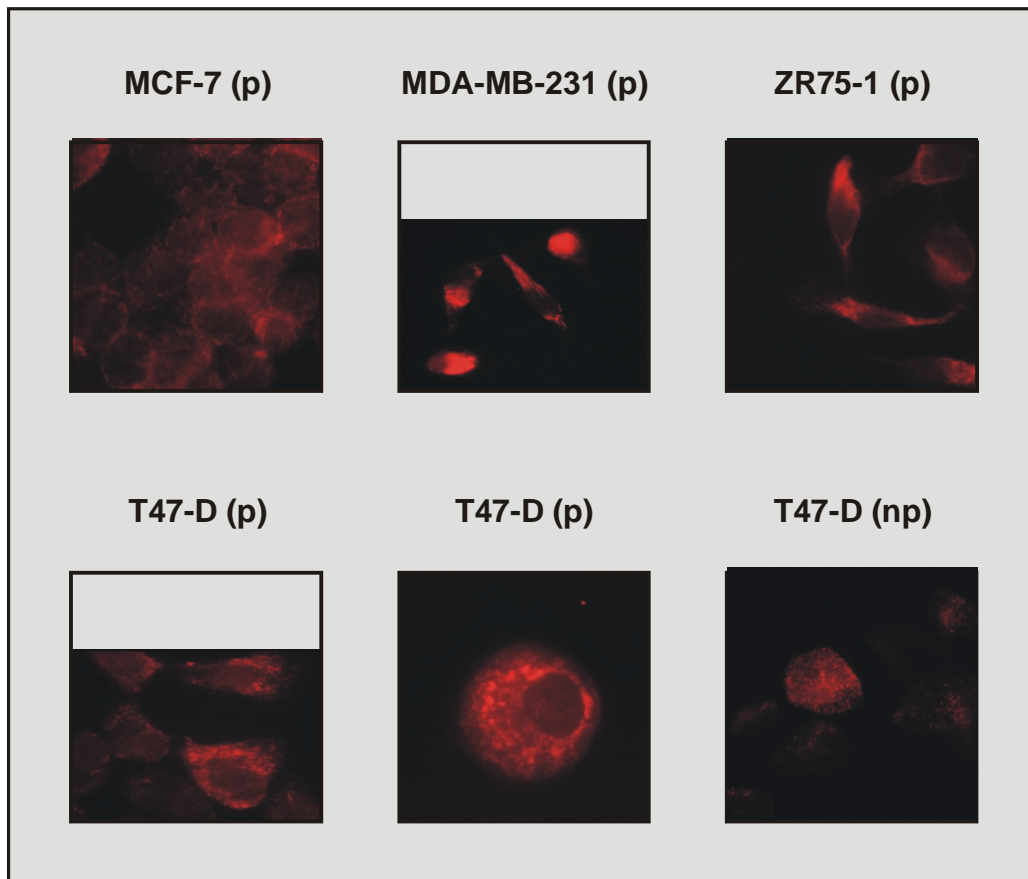


Abb. 33: Immunfluoreszenzfärbung von BSP in Brustkrebszell-Linien.

Vier verschiedene Mammakarzinomzell-Linien (MCF-7, MDA-MB-231, T47-D und ZR75-1) wurden nach Fixierung mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen BSP inkubiert, der mit einem Zweitantikörper detektiert wurde, welcher an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Alle Zellen sind in permeabilisierter (p) und nicht-permeabilisierter Form (np) angefärbt worden. Dargestellt sind die positiven intrazellulären Färbungen sowie die Zelloberflächenfärbung der T47-D Zellen. Die Abbildungen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Verwendung verschiedener Kulturbedingungen führte zu keinem Unterschied in der Expressionsanalyse und die unterschiedlichen Antikörper ergaben vergleichbar ähnliche Signale. Mit Hilfe der FACS-Messungen konnte BSP auf der Oberfläche der MCF-7 Zell-Linie nachgewiesen werden, obwohl bei diesen Zellen in der Immunfluoreszenz kein entsprechendes BSP-Signal zu sehen war. Ansonsten stimmen die Immunfluoreszenzdaten mit den FACS-Daten überein, wenn man eine FACS-Färbung von weniger als 5% als negativ für BSP wertet (s. Tab. 16).

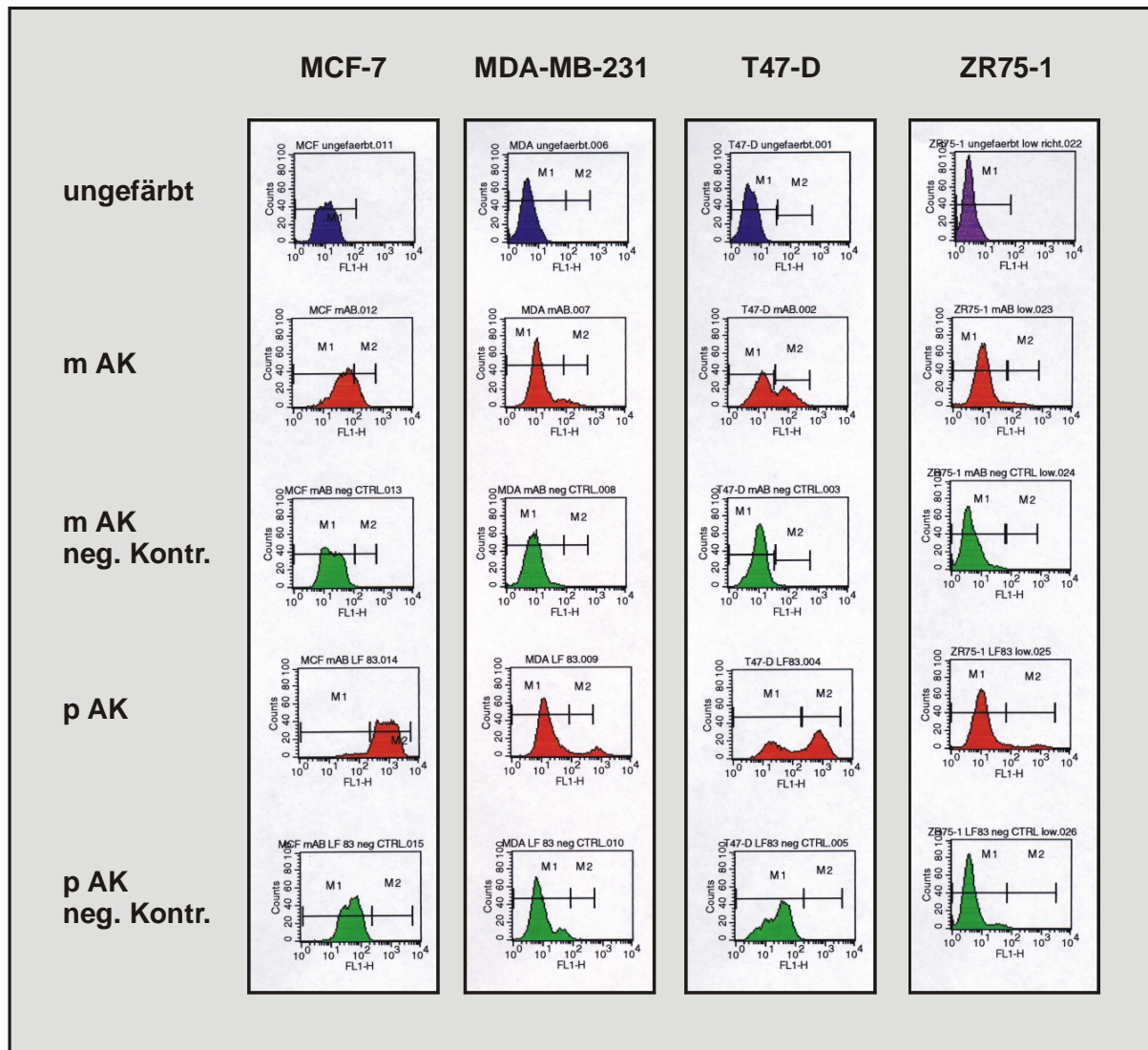


Abb. 34: FACS-Analysen von BSP auf Brustkrebszell-Linien.

Mit 1% (w/v) EDTA wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und jeweils 10^6 Zellen mit dem monoklonalen BSP-Antikörper (m AK) bzw. mit dem polyklonalen LF83-Antikörper (p AK) inkubiert. Nach Zugabe von einem Zweitantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DTAF oder FITC) konjugiert ist, wurde die Fluoreszenz auf den Zelloberflächen mit einem FACS-Gerät gemessen. Als Kontrollen wurden sowohl ungefärbte Zellen als auch nur mit dem Zweitantikörper inkubierte Zellen (neg. Kontr.) gemessen. Auf der Abszisse ist der Kanal für die Fluoreszenzdetektion (FL1-H) angegeben, die Ordinate bezeichnet den prozentualen Anteil der gemessenen Fluoreszenzeinheiten (counts). Mit M1 und M2 sind die anhand der Negativkontrollen als positiv (M2) oder negativ (M1) definierten Bereiche bezeichnet.

Der Anteil der BSP-positiven Zellen lag je nach verwendetem Antikörper bei 17-92% für MCF-7, bei 37-53% für T47-D, bei 5% für MDA-MB-231 und bei 3-5% für ZR-75-1 (s. Abb. 34, Tab. 16).

Antikörper	MCF-7	MDA-MB-231	T47-D	ZR-75-1
mAK	17%	5%	37%	3%
pAK	92%	5%	53%	5%

Tab. 16: Prozentuale Anteile der mittels FACS-Analysen ermittelten BSP-positiven Zellen.

Für die mit zwei verschiedenen BSP-Antikörpern untersuchten Mammakarzinomzell-Linien sind die mit Hilfe des cell quest Programms aus den FACS-Daten (s. Abb. 34) berechneten prozentualen Anteile der Zellen mit BSP auf der Zelloberfläche aufgelistet.

4.4.2.2 Adhäsion von Brustkrebszellen an rekombinantes BSP

Zur Überprüfung der Adhäsion der vier verschiedenen Brustkrebszell-Linien an rekombinantes BSP wurde das Protein in unterschiedlichen Mengen an die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Zugabe der Zellen und Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ wurden die nicht adhärennten Zellen entfernt. Die adhärennten Zellen wurden fixiert, angefärbt und die Absorption des Farbstoffes bei 570 nm gemessen (s. Abb. 35).

Alle untersuchten Brustkrebszell-Linien adhärennten unterschiedlich an natives rekombinantes BSP. MCF-7 und ZR75-1 Zellen zeigten die stärkste Adhäsion, während T47-D und MDA-MB-231 zwei bis dreifach schlechter an das BSP banden. Die Adhäsion scheint somit unabhängig von der endogenen BSP-Expression auf der Zelloberfläche zu erfolgen, da sowohl die MCF-7 (BSP auf der Zelloberfläche) als auch die ZR75-1 Zellen (kein BSP auf der Zelloberfläche) sehr gut an das rekombinante Protein adhärennten. Dahingegen zeigte die zweite für BSP auf der Zelloberfläche positive Zell-Linie (T47-D) nur eine sehr schwache Adhäsion (s. Abb. 35).

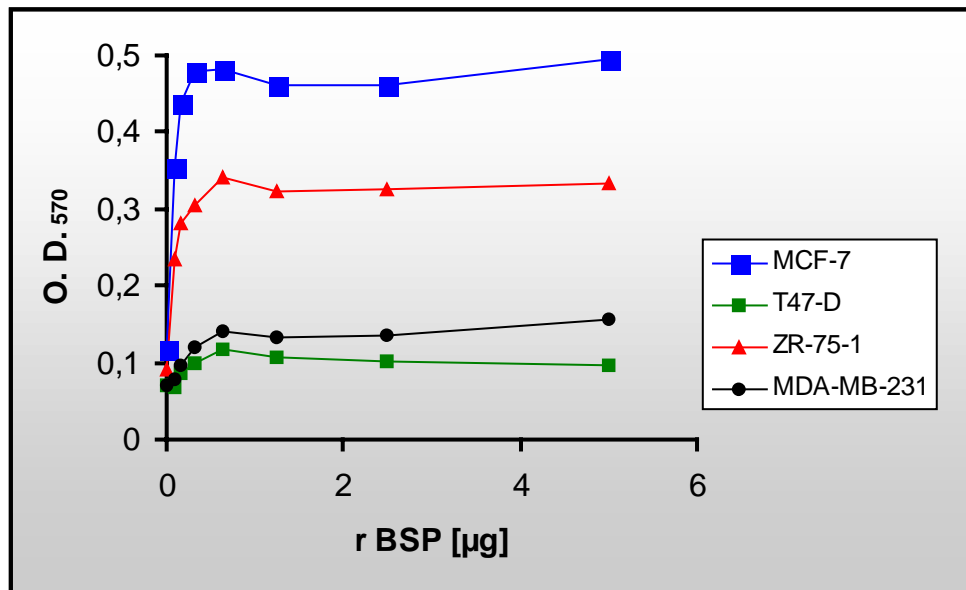


Abb. 35: Adhäsion von Brustkrebszell-Linien an rekombinantes BSP.

Auf der Abszisse sind die Mengen an rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen (r BSP) angegeben, mit denen die Löcher der Mikrotiterplatte beschichtet wurden. Die Ordinate bezeichnet die Absorptionswerte bei 570 nm. Pro Ansatz wurden jeweils 5×10^4 Zellen eingesetzt, wobei die Messungen stets als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die untersuchten Zell-Linien sind durch vier verschiedene Kurven repräsentiert.

Um den Einfluss der nativen Struktur von rekombinantem BSP auf die Zellbindungseigenschaften des Proteins zu untersuchen, wurde BSP in nativem Zustand (in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0), in denaturierter Form (nach Dialyse gegen 6 M Gu-HCl) und in wieder renaturierter Form (nach Dialyse gegen 6 M Gu-HCl gefolgt von Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) an die Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Bindung gleicher Mengen der verschiedenen BSPs an das Plastik wurde mittels ELISA verifiziert und der Adhäsionsassay wie oben beschrieben durchgeführt.

Eine Abnahme der Adhäsion bei Verwendung von denaturiertem BSP und eine Zunahme der Adhäsion bis zu ca. 90% des Normalwertes bei der Verwendung von wieder renaturiertem Material war ebenfalls für alle vier Zell-Linien sichtbar (s. Abb. 36 und nicht gezeigt). Somit scheint denaturiertes BSP andere Zellbindungseigenschaften zu haben als das native Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ausbildung einer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des BSPs für die Zellbindung wichtig ist.

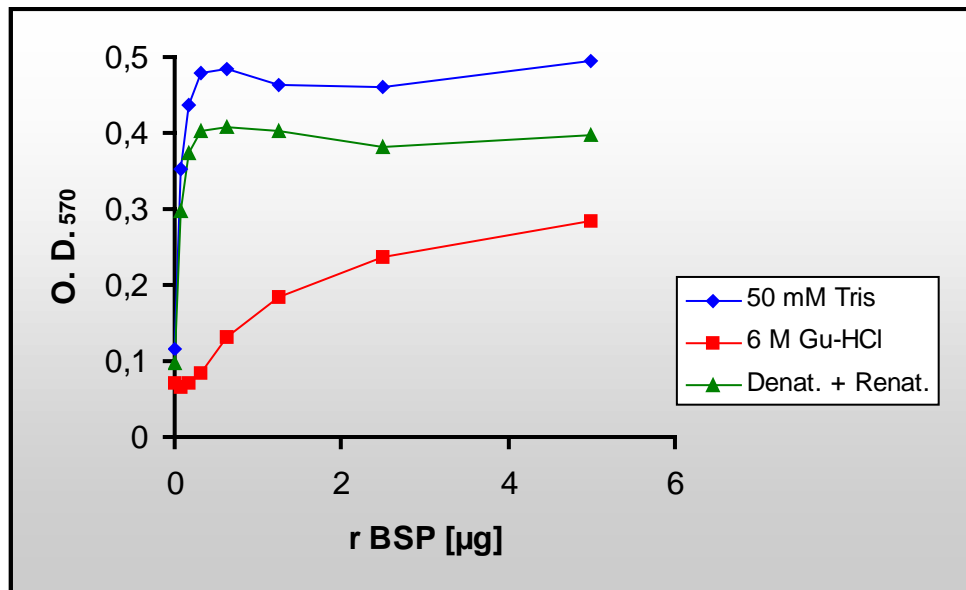


Abb 36: Adhäsion von MCF-7 Zellen an rekombinantes BSP.

Auf der Abszisse sind die Mengen an rekombinantem BSP aus EBNA-293 Zellen (r BSP) angegeben, mit denen die Löcher der Mikrotiterplatte beschichtet wurden. Die Ordinate bezeichnet die Absorptionswerte bei 570 nm. Pro Ansatz wurden 5×10^4 MCF-7-Zellen eingesetzt, wobei die Messungen stets als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die drei verschiedenen Kurven repräsentieren die Werte für natives BSP (50 mM Tris), denaturiertes BSP (6 M Gu-HCl) und wieder renaturiertes Protein (Denat. + Renat.).

5 Diskussion

Bone Sialoprotein wurde rekombinant in verschiedenen humanen Zell-Linien hergestellt und unter nativen Bedingungen aus humanen Knochen aufgereinigt. Basierend hierauf konnten die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der BSPs verschiedener Herkunft miteinander verglichen werden. Hieraus können Informationen über den Beitrag der nativen Form des Proteins und der posttranslationalen Modifizierungen zur Struktur und Funktion von BSP erhalten werden.

5.1 Strukturmerkmale von rekombinantem und aus Knochen isoliertem BSP

Das rekombinant in verschiedenen Zell-Linien hergestellte BSP ließ sich nach Auftrennung mittels SDS-PAGE als breite Bande mit einer Größe von ca. 70-80 kDa identifizieren, während sich das aus Knochen isolierte BSP bei ca. 70 kDa im unteren Bereich der rekombinanten BSP-Bande befand (s. Abb. 8, Abb. 10). Die Größe von unter denaturierenden Bedingungen aus humanen Knochen isoliertem BSP wurde nach SDS-PAGE ebenfalls mit 80 kDa bestimmt (Fisher et al., 1987). Für BSPs, die aus anderen Spezies isoliert wurden, lagen die in der SDS-PAGE ermittelten Größen zwischen 55 kDa und 82 kDa (Heinegård et al., 1989 a, Kasugai et al., 1992, Ek-Rylander et al., 1994, Fisher et al., 1983, Zhang et al., 1990), was sowohl auf Unterschiede in den Sequenzen und posttranslationalen Modifizierungen als auch auf die verschiedene Prozentigkeit der verwendeten Gele zurückzuführen sein könnte. Dass BSP in der SDS-PAGE nicht als scharfe, sondern als diffuse Bande mit einer Größe, die ca. zweifach über dem theoretisch berechneten Molekulargewicht (33,6 kDa für humanes BSP, Fisher et al., 1990) liegt, wandert, liegt wahrscheinlich an dem hohen Anteil posttranslationaler Modifizierungen. Dabei machen Kohlenhydrate insgesamt ca. 50% des Gesamtgewichts des Proteins aus (Fisher et al., 1983, Franzén et al., 1985, Midura et al., 1990). Die breite Massenverteilung wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie von rekombinantem BSP, dessen Masse zwischen 40 kDa und 75 kDa lag, bestätigt. Dabei lag die mittlere Masse bei 56,8 kDa und war vergleichbar mit der durch Gleichgewichtszentrifugation bestimmten Molekularmasse von 57,3 kDa für aus bovinen Knochen unter denaturierenden Bedingungen isoliertem BSP (Franzén et al., 1985).

Während sich das rekombinante BSP nach SDS-PAGE sowohl mit Coomassie-Blau als auch mit Silbernitrat anfärben ließ, konnte das aus Knochen isolierte BSP nicht mit Coomassie-

Blau und nur schwach mit Silber angefärbt werden (s. Abb. 8, Abb. 10). Beide Proteine zeigten nach Anfärbung mit dem kationischen Farbstoff Stains All eine für saure Proteine charakteristische Blaufärbung. Fisher et al. (1987) haben BSP aus bovinen Knochen ebenfalls nicht mit Coomassie-Blau, sondern nur mit Alcian-Blau oder Stains All anfärben können, erwähnen aber, dass nach Behandlung des BSPs mit Neuraminidase die Färbung mit Coomassie-Blau möglich war. Ek-Rylander et al. (1994) konnten BSP aus Rattenknochen mit Coomassie-Blau anfärben. Da die aus verschiedenen Spezies isolierten BSPs in ihrer Aminosäuresequenz ähnlich sind, könnten unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen der Grund für die verschiedene Färbbarkeit der Proteine sein.

Die Anwesenheit der N-Acetylneuraminsäuren, die ausschlaggebend für die Namensgebung des Bone Sialoproteins war, wurde u. a. von Fisher et al. (1983) nachgewiesen und ist auch in dieser Arbeit sowohl für rekombinantes als auch für Knochen-BSP gezeigt (s. Abb. 18, Abb. 20).

Für bovines und Ratten-BSP konnte nach Derivatisierung der Phosphatgruppen mittels Aminosäureanalyse festgestellt werden, dass ca. die Hälfte aller Serine phosphoryliert waren, während nur ca. ein Achtel aller Threonine (drei von 24 beim Ratten-BSP) eine Phosphatgruppe trug, wobei es geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Spezies gab (Heinegård et al., 1989 a, Salih et al., 1996). Die Behandlung des rekombinanten BSPs mit Protein Phosphatase 1 führte zu keiner Größenveränderung im Vergleich zu unbehandeltem BSP nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt). Übereinstimmend hiermit konnten Ek-Rylander et al. (1994) keine Größenveränderung von BSP aus Knochen der Ratte nach Behandlung mit Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) in der SDS-PAGE beobachten. Trotzdem wurden durch Dephosphorylierung mittels TRAP 60% der zuvor radioaktiv markierten Phosphatreste vom BSP abgespalten, während saure Phosphatase aus humaner Prostata und alkalische Phosphatase aus boviner Niere keine Effekte hatten. Dass der Phosphotyrosin-Antikörper im Immunoblot nicht an das rekombinante BSP gebunden hat, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Tyrosine entweder nicht phosphoryliert sind oder durch die starke Glykosylierung des Proteins für den Antikörper nicht zugänglich waren. Die Frage, ob das rekombinante BSP Phosphatgruppen trägt, bleibt somit offen.

Die Analyse der Sekundärstrukturelemente von rekombinantem BSP und von Knochen-BSP mittels CD-Spektroskopie ergab für beide Proteine Spektren, die auf einen geringen Anteil an α -Helix und β -Faltblatt Strukturen und einen hohen Anteil an Zufallsknäuelstruktur hindeuten (s. Abb. 14). Dennoch unterscheidet sich das aus humanen Knochen isolierte BSP in seinem

CD-Spektrum und damit in seiner Sekundärstruktur deutlich vom rekombinanten Protein, was sich nach Analyse der Spektren mit Hilfe des CONTIN-Computerprogramms hauptsächlich in dem gegenüber rekombinantem BSP um 11% höheren Anteil an Zufallsknäuelstruktur äußert (s. 4.3.4.1). Da beide Proteine identische Sequenzen haben, könnten diese Sekundärstrukturunterschiede entweder auf unterschiedliche Glykosylierungen (s. 4.3.5.1 und 4.3.5.2) oder auf denaturierende Bedingungen im Hydroxylapatit des Knochens zurückzuführen sein. Dass das aus Knochen isolierte BSP jedoch nicht vollständig denaturiert ist, lässt sich anhand des deutlich unterschiedlichen Spektrums von rekombinantem BSP, das durch Zugabe von 6 M Gu-HCl denaturiert wurde, erkennen (s. Abb. 14).

Die Zugabe von Ca^{2+} und P_i Ionen zu rekombinantem BSP hatte keinen Einfluss auf CD-messbare Veränderungen der Sekundärstruktur (s. Abb. 15). Einen Hinweis darauf, dass Ca^{2+} Ionen an rekombinantes BSP binden und dadurch eine Konformationsänderung des Proteins bewirken, konnte durch den in Gegenwart von CaCl_2 verstärkten Abbau des Proteins mit der Calcium unabhängig spaltenden Protease α -Chymotrypsin erhalten werden (s. Abb. 16). Dieser Effekt war jedoch sehr klein und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Chen et al. (1992) haben eine Bindung von radioaktiv markiertem Calcium an BSP, das auf Nitrozellulose immobilisiert war, nachgewiesen. Da mit dieser Methode erhaltene Daten in Abhängigkeit von den gewählten Waschbedingungen variieren, sind die Ergebnisse kritisch zu bewerten.

Nach Rotationsbedampfung bzw. Negativkontrastierung zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem BSP eine globuläre Struktur, die mit einer elongierten Struktur verbunden war (s. Abb. 22). Die elongierte Struktur entspricht vermutlich dem stark glykosylierten Hauptanteil des Proteins, während die globuläre Struktur wahrscheinlich dem glykanfreien C-terminalen Ende (s. Tab. 15, Abb. 37) entspricht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von unter denaturierenden Bedingungen aus bovinen Knochen isoliertem BSP zeigten eine lineare Struktur mit einer terminalen Faltung (Franzén et al., 1985). Die Gesamtlänge des bovinen BSPs von 40 nm ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit ermittelten Größen des rekombinanten humanen BSPs von 10 +/- 1 nm für den Durchmesser der globulären Struktur und 25 +/- 6 nm für die elongierte Struktur, welche zusammen eine Länge von 35 +/- 7 nm ergeben. Von Stubbs et al. (1997) wurden 59 Aminosäuren der C-terminalen Region, die die RGD-Sequenz enthält und wahrscheinlich frei von Glykanen ist, rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels NMR als flexible Zufallsknäuelstruktur beschrieben. Da die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des BSPs eine globuläre Struktur zeigen, die wahrscheinlich dem C-Terminus entspricht, ist das in *E. coli* exprimierte

BSP-Fragment im Vergleich zum rekombinanten humanen BSP strukturell sehr unterschiedlich.

5.2 Glykosylierung von BSP

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die N-Glykan- und O-Glykan-Strukturen auf humanem Knochen BSP und auf rekombinantem BSP aus der humanen Nierenzell-Line EBNA-293 bestimmt.

Die Aminosäuresequenz von humanem BSP enthält vier potenzielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 90 (NTT), 163 (NGT), 168 (NST) und 176 (NGS). Von insgesamt 53 Serinen und Threoninen wurden mit Hilfe des NetOGlyc Computerprogramms 11 potenzielle O-Glykosylierungsstellen für BSP vorausgesagt. Da für O-Glykosylierungen keine den N-Glykanen vergleichbare Konsensussequenz bekannt ist (Gooley et al., 1994, Nehrke et al., 1996), basiert das NetOGlyc Programm auf einer statistischen Analyse von 299 bekannten mucinartigen O-Glykosylierungsstellen und 2516 nicht glykosylierten Serinen und Threoninen von 60 charakterisierten Glykoproteinen, wobei die Sequenzumgebung und Oberflächenzugänglichkeit der Serine und Threonine mit einbezogen wurde (Hansen et al., 1995, 1997, 1998).

Die Abspaltung aller N-Glykane mit Peptid N-Glykosidase F führte zu einer Verringerung der Masse des BSPs um 4,7 kDa (s. Abb. 13), während die Behandlung des Proteins mit Endoglykosidase H, einem Enzym, das nur mannosereiche N-Glykane hydrolysiert, keine Massenveränderung des Proteins hervorrief. Daraus kann abgeleitet werden, dass auf BSP ausschließlich N-Glykane vom Komplex-Typ vorkommen. Die Analyse der BSP N-Glykane mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie führte zur Identifikation von Strukturen mit zwei bis vier Antennen, an die jeweils eine bis vier N-Acetylneuraminsäuren gebunden sein können. Alle BSP N-Glykane trugen eine core Fucose und bi- und triantennäre Strukturen kamen zusätzlich als GlcNAc β 1,4-geteilte N-Glykane vor (s. Tab. 10, Tab. 12, Abb. 17). Die zahlreichen Möglichkeiten der Kombination dieser Strukturen führen zu einem sehr komplexen BSP N-Glykosylierungsmuster. Alle identifizierten N-Glykan-Strukturen waren sowohl auf dem aus Knochen isolierten BSP als auch auf dem rekombinanten EBNA-293 BSP zu finden. Deutliche Unterschiede zwischen den N-Glykanen der beiden Proteine gab es jedoch im prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen an den gesamten N-Glykanen. So bestand der Hauptanteil der BSP N-Glykane im Knochen aus triantennären Strukturen (58%) und in der EBNA-293 Zell-Linie aus tetraantennären Strukturen (48%)

(s. Abb. 17, Tab. 12). Beim Knochen BSP waren Strukturen mit drei Sialinsäuren vorherrschend (52%), während beim EBNA-293 BSP Mono-, Di-, Tri-, und Tetrasialostrukturen mit einem jeweiligen Anteil von 20-30% relativ gleichmäßig vorkamen (s. Abb. 18, Tab. 13). Wenn man die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile der ladungsmäßig einheitlichen Peakgruppen mit der Anzahl der entsprechenden N-Acetylneuraminsäuren multipliziert (s. Tab. 13) und dadurch die hypothetische Ladungszahl Z nach Hermentin et al. (1996) bestimmt, ist diese für die N-Glykane von Knochen BSP ($Z = 223$) und EBNA-293 BSP ($Z = 228$) nur geringfügig unterschiedlich.

Für das aus Knochen isolierte extrazelluläre Matrixprotein BM-40 (Osteonectin), das, wie BSP, 15% der gesamten nicht-collagenartigen Proteine des Knochens ausmacht und zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen besitzt, wurde der mannosereiche N-Glykosylierungstyp bestimmt. Aus Blutplättchen sowie aus Kulturüberständen verschiedener Osteosarkomzell-Linien, einer Endothelzell-Linie und der Nierenzell-Linie EBNA-293 aufgereinigtes BM-40 war dagegen mit N-Glykanen vom Komplex-Typ glykosyliert (Kelm et al., 1990, 1991, 1992, B. Kaufmann, pers. Mitteilung). Dass das aus humanen Knochen isolierte BSP im Vergleich zu BM-40 aus Knochen keine mannosereichen N-Glykane trägt, ist vermutlich auf grundsätzliche Unterschiede der beiden Proteine in der Aminosäuresequenz, der Existenz anderer posttranslationaler Modifizierungen (z. B. O-Glykane, Phosphate, Sulfate), der Tertiärstruktur und der dadurch verschiedenen Zugänglichkeiten der N-Glykosylierungsstellen zurückzuführen. Da mannosereiche N-Glykane den Oligosaccharid-Vorstufen und Zwischenprodukten der Bildung von Komplex-Typ N-Glykanen entsprechen, sollte die Synthese von beiden Typen von N-Glykanen in Zellen, die Komplex-Typ N-Glykane synthetisieren können, jedoch möglich sein. Deshalb könnte die Ursache für die unterschiedliche Glykosylierung von BSP und BM-40 im Knochen auch darin liegen, dass jedes Protein von einem anderen Osteoblastentyp synthetisiert wird.

In Übereinstimmung mit den Daten für die N-Glykane des BSPs aus der EBNA-293 Zell-Linie konnte von Li et al. (2000) gezeigt werden, dass die HEK-293 Zell-Linie in Abhängigkeit von der Lokalisation der N-Glykosylierungsstelle eines Erythrozytenproteins sowohl N-Glykane vom Komplex-Typ als auch mannosereiche N-Glykane an die Polypeptidkette anheften kann. Die EBNA-293 Zell-Linie unterscheidet sich von der HEK-293 Zell-Linie nur durch ihre Neomycin-Resistenz.

Das extrazelluläre Matrixprotein Osteocalcin, welches ebenfalls einen Anteil von ca. 15% der nicht-collagenartigen Proteine des humanen Knochens ausmacht, besitzt keine Konsensus-

sequenz für die N-Glykosylierung und ist aufgrund der Abwesenheit von Serinen und Threoninen nicht O-glykosyliert (Poser et al., 1980).

Die Analyse der BSP O-Glykane mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie führte zur Identifikation von acht verschiedenen mucinartigen O-Glykan-Strukturen (s. Abb. 20, Tab. 14). Während O-Glykane, die sich vom *core1* ableiten, sowohl auf rekombinantem als auch auf Knochen-BSP zu finden waren, waren Strukturen, die auf *core2* aufbauen, nur auf rekombinantem BSP vorhanden. Die Abwesenheit von *core2*-O-Glykanen auf Knochen BSP könnte durch fehlende *core2*- β 1,6 N-Acetylglukosaminyltransferase-Aktivität in Osteoblasten verursacht werden. Über die Aktivität dieses für die *core2*-Synthese verantwortlichen Enzyms in Osteoblasten konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden. Unterschiede zwischen den O-Glykanen von Knochen BSP und EBNA-293 BSP gab es auch im prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen an den gesamten O-Glykanen. Der Hauptanteil der O-Glykane des Knochen BSPs bestand mit 66% aus einer disialinisierten *core1*-Struktur, während die vier Haupt-O-Glykan-Strukturen des EBNA-293 BSPs mit jeweils ca. 20% aus mono- oder disialinisierten *core1*- und *core2*-Strukturen bestanden (s. Tab. 14). Bei beiden BSP O-Glykan-Präparationen waren keine fukosylierten Strukturen zu finden und der Anteil der nicht sialinisierten Strukturen war mit 12% für Knochen BSP bzw. 5% für rekombinantes BSP niedrig. Multipliziert man die prozentualen Anteile der Peaks mit der Anzahl der N-Acetylneuraminsäuren der entsprechenden Strukturen (s. Tab. 14), erhält man für die O-Glykane des Knochen-BSPs einen größeren Wert (160) als für die EBNA-293-O-Glykane (125), was auf einen höheren Anteil an N-Acetylneuraminsäuren hindeutet. Dies könnte u. a. eine Erklärung für die im Vergleich zu rekombinantem BSP schlechtere Färbbarkeit des Knochen-BSPs mit Coomassie-Blau sein. Midura et al. (1996) haben auf BSP aus der Ratten-Osteosarkomzell-Linie UMR-106 fünf verschiedene O-Glykan-Strukturen identifiziert, die sich von *core1* oder *core2* ableiten und auch in dieser Arbeit für humanes BSP gefunden wurden. Eine von Midura et al. (1996) identifizierte sechste Struktur ist von *core6* abgeleitet und war auf humanem BSP nicht zu finden. Bei den von Midura et al. (1996) publizierten Daten handelt es sich lediglich um einen kurzen Übersichtsartikel, bei dem die methodische Vorgehensweise fraglich erscheint. Zusätzlich wurden von Midura et al. (1990, 1995) auf UMR-106-BSP sulfatierte N- und O-Glykane gefunden, für die es bei der Analyse der humanen BSP-Glykane keine Hinweise gab. Die Unterschiede in der O-Glykosylierung von humanem BSP und von Ratten-BSP könnten sowohl durch Abweichungen in der Aminosäuresequenz (70% Identität, Fisher et al., 1990) als auch durch die verschiedene Expression, Aktivität und Anordnung von Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat von Ratten- und humanen Osteoblasten erklärt werden.

Interessanterweise sind die O-Glykan-Strukturen von Knochen BSP und von rekombinantem Mucin 1 aus der Mammakarzinomzell-Linie T47-D ähnlich (Müller et al., 2000). T47-D Zellen exprimieren kein *core2*-Enzym und besitzen eine erhöhte Sialyltransferase-Aktivität, was zu den kurzen, stark sialinisierten *core1*-Strukturen führt, die typisch für Tumorzellen sind (Brockhausen et al., 1995, 1999). Ob diese auf BSP aus humanen Knochen und in Tumorzellen häufig vorkommende O-Glykosylierung im Zusammenhang mit der Funktion von BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen steht, ist noch nicht geklärt. Wichtig wäre die Beantwortung der Frage, ob sich das in Brusttumorzellen exprimierte BSP von Knochen BSP unterscheidet. Um sichere Informationen hierüber zu bekommen, müsste BSP aus Tumormaterial aufgereinigt werden. Rekombinant in Mammakarzinomzell-Linien hergestelltes BSP ist speziell für die vergleichende Analyse der O-Glykane nicht geeignet, weil für rekombinantes Mucin 1 gezeigt werden konnte, dass die Mammakarzinomzell-Linien MCF-7, MDA-MB-231, T47-D und ZR-75-1 jeweils ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster ergeben (Müller et al., 2000).

Die massenspektrometrische Analyse von partiell deglykosylierten BSP-Peptiden, die durch glykosidischen und proteolytischen Verdau des his₆-myc-EK-BSPs aus EBNA-293 Zellen erhalten wurden, führte zur Identifizierung von acht O-Glykosylierungsstellen (s. Tab. 15). Dass alle acht Stellen potenziell glykosyliert sein können, dies jedoch nicht immer der Fall ist, kann aus der Identifizierung von gleichen Peptiden mit unterschiedlicher Anzahl gebundener O-Glykanreste geschlossen werden. Somit ist auch beim BSP die bei vielen Glykoproteinen vorhandene Mikroheterogenität festzustellen. Mittels Ansequenzierung einzelner Peptide und durch den Vergleich der gemessenen Massen mit den theoretisch berechneten Werten wurden die O-Glykosylierungsstellen in der BSP-Sequenz den aufgrund ihrer Sequenzumgebung mit größter Wahrscheinlichkeit glykosylierten Aminosäuren zugewiesen (s. Abb. 37). Für die dritte Glykosylierungsstelle in Peptid 151-180 konnte keine Zuweisung vorgenommen werden. Vier der mittels Massenspektrometrie zugewiesenen O-Glykosylierungsstellen stimmen mit denen überein, die mit Hilfe des NetOGlyc Computerprogramms (Hansen et al., 1995, 1997, 1998) ermittelt wurden. Bei drei Tyrosinen konnte entgegen der Computervorhersage eine Glykosylierung festgestellt werden. Leider konnten mit dieser Methode nicht genug BSP-Peptide erhalten werden, um die komplette BSP-Sequenz im Hinblick auf ihre O-Glykosylierungsstellen zu charakterisieren. Betrachtet man die mittels massenspektrometrischer Analyse identifizierten nicht glykosylierten Peptide aus dem C-terminalen Bereich des Proteins (288-294, 336-351) und berücksichtigt, dass laut NetOGlyc von Aminosäure 283-351 keine potenziellen O-Glykosylierungsstellen vorhergesagt wurden, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass der C-Terminus des BSPs nicht glykosyliert ist.



Abb. 37: Glykosylierung von rekombinantem BSP.

Die in der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Peptide (s. Tab. 15) sind umrahmt und mit der Nummer der Aminosäuren bezeichnet, die his₆-myc-EK-Fusionspeptidsequenz ist kursiv gedruckt, N-glykosylierte Asparagine (▼) und O-glykosylierte Tyrosine (●) sind fett gedruckt. Die mit Hilfe des NetOGlyc Computerprogramms ermittelten potenziellen O-Glykosylierungsstellen sind grau unterlegt.

Nach Behandlung des rekombinanten BSPs mit Chondroitinase ABC ergab sich keine Größenveränderung nach Auftrennung des Proteins mittels SDS-PAGE (s. Abb. 21). Diese Daten stimmen mit Beobachtungen für bovines BSP und humanes BSP aus der Osteosarkomzell-Linie SAOS-2 überein, wobei dort zusätzlich keine Größenveränderung nach Heparitinase- oder Keratanase-Behandlung gezeigt werden konnte (Fisher et al., 1983, McQuillan et al., 1995). Chondroitinsulfat-, Dermatan-sulfat-, Heparansulfat- und Keratan-sulfatketten scheinen somit auf humanem bzw. bovinem BSP nicht vorhanden zu sein. Bisher konnte nur das BSP aus Schädelknochen des Kaninchens als Keratansulfat-Proteoglykan identifiziert werden (Kinne et al., 1987).

5.3 Charakterisierung der Interaktion von BSP mit den extrazellulären Matrixproteinen Collagen I und Fibronectin

BSP konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen im Cytosol von zwei Wochen postkonfluent kultivierten SAOS-2 und UMR-108 Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 28). Die intra-zelluläre BSP-Färbung war, genauso wie die Anfärbung des Collagen I- und Fibronectin-

Netzwerks in der perizellulären Matrix (s. Abb. 27), unabhängig von der Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure. Eine Kolokalisation von BSP mit Fibronectin und Collagen I konnte nicht beobachtet werden. Diese Daten stimmen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Nefussi et al. (1997) überein, die zeigen, dass BSP in Primärkulturen von Zellen aus fötalen Schädelknochen der Ratte zwar mit Hydroxylapatitkristallen, aber nicht mit Collagen-Fibrillen assoziiert ist.

In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzdaten konnte auch in einem ELISA-artigen Festphasenbindungsassay keine Bindung von rekombinantem BSP an verschiedene Formen von Collagen I aus boviner Haut (hitzedenaturiert, fibrillär, einzelsträngig) nachgewiesen werden (s. Abb. 24), wobei die Zugabe von 5 mM CaCl_2 oder 0,5 mM ZnCl_2 keine Veränderung in der Affinität bewirkte. Ebenso erfolgte keine Bindung von rekombinantem BSP an Cyanogenbromid-gespaltene Collagen I und Collagen II Fragmente, die an Nitrozellulose gebunden waren.

Fujisawa et al. (1992) haben gezeigt, dass BSP in ihrem Festphasenbindungsassay an Collagen I-Fibrillen aus bovinen Sehnen, an denaturiertes Collagen I und an decalcifiziertes Knochenpulver bindet und die Fibrillogenese von Collagen I fördert. Dieses Assaysystem wies jedoch im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Assay zahlreiche Unterschiede auf. Unter anderem wurde statt nativem Protein BSP verwendet, das unter denaturierenden Bedingungen aus bovinen Knochen aufgereinigt wurde. Des Weiteren haben Fujisawa et al. (1995) gezeigt, dass die Abspaltung der N-Acetylneuraminsäuren des BSPs die Affinität des Proteins zu Collagen I erhöht, dass BSP hauptsächlich an die $\alpha 2$ Kette bindet und vorzugsweise in den Lücken zwischen den Tropocollagenmolekülen lokalisiert ist. Hierbei wurden die ELISA-artigen Festphasenbindungsassays ohne Blockierung der Plastikbindungsstellen durchgeführt. Bei den Immunoblots wurde ebenfalls kein Blockierungsreagenz erwähnt und Kontrollen in Form von Kompetitierungsreaktionen mit unmarkiertem BSP bei der Bindung von Biotin-markiertem BSP an die Cyanogenbromid gespaltenen Collagen I-Fragmente wurden nicht durchgeführt. Außerdem war nach Behandlung des BSPs mit Neuraminidase bzw. Erhitzung des Proteins in 0,01 M HCl keine Größenveränderung, sondern nur eine Verringerung der Stärke der Originalbande im SDS-Gel zu erkennen, sodass man die von Fujisawa et al. (1995) postulierte Entfernung der N-Acetylneuraminsäuren, die das Molekulargewicht um 9% reduzieren sollte, nicht nachvollziehen konnte. Die von Fujisawa et al. verwendeten Assays zum Nachweis der Interaktion von Collagen I mit BSP bieten somit mehrere Möglichkeiten für unspezifische Reaktionen.

Chen et al. (1992) konnten in einem ELISA-artigen Festphasenbindungsassay unter Verwendung von BSP, das unter denaturierenden Bedingungen aus Schädelknochen der Ratte isoliert und danach radioaktiv markiert wurde, keine Bindung an Collagen I aus boviner Haut zeigen. Da auch hier unspezifische Plastikbindungsstellen nicht blockiert wurden, konnte festgestellt werden, dass BSP stärker an das ungeblockte Plastik als an Collagen beschichtete Löcher adhärierte. Dies konnte durch eigene Beobachtungen bei der Etablierung des Collagen I-BSP-Bindungsassays bestätigt werden. Gleichzeitig werden durch dieses Ergebnis die Daten von Fujisawa et al. (1992, 1995) nochmals in Frage gestellt.

Bisher gibt es keine in vivo Daten, die eine Bindung von BSP an Collagen I zeigen. Die in dieser Arbeit und von anderen Arbeitsgruppen ermittelten in vitro Bindungsdaten sind von dem gewählten Assaysystem abhängig. In Zellkulturmodellen, die näher an in vivo Bedingungen liegen als die Festphasenassays, konnte keine Kolo-kalisation von BSP und Collagen I gezeigt werden. Interessanterweise konnte für BM-40 aus Knochen eine Bindung an Collagen Typ I, III und V gezeigt werden, während BM-40 aus Blutplättchen an keinen der untersuchten Collagen-Typen gebunden hat (Kelm et al., 1991). Da sich die beiden Proteine identischer Sequenz u. a. in der Anwesenheit von N-Acetylneuraminsäuren auf dem BM-40 aus Blutplättchen unterscheiden, wurde aufgrund dieser Daten postuliert, dass N-Acetylneuraminsäuren einen inhibierenden Effekt auf die Bindung des Proteins an Collagene haben. Dies könnte für BSP mit einem Anteil von 12% N-Acetylneuraminsäuren ebenfalls zutreffen.

5.4 BSP als Nukleator für Hydroxylapatitkristalle

Obwohl die normale Funktion des Knochens von dem koordinierten Zusammenwirken verschiedener Zelltypen abhängig ist (s. 2.1), sind die Osteoblasten primär für die Synthese der extrazellulären Knochenmatrix, die später durch die Einlagerung von Hydroxylapatit verkalkt, verantwortlich. Aufgrunddessen werden für viele in vitro Modelle der mineralisierten Knochenmatrix primäre Osteoblasten oder Osteosarkomzell-Linien verwendet. Für diese Arbeit wurde die humane Osteosarkomzell-Linie SAOS-2 und die Ratten Osteosarkomzell-Linie UMR-108 gewählt, weil beide im Hinblick auf ihre Ähnlichkeit zu Osteoblasten sehr gut charakterisiert sind. Zu den beiden Zell-Linien gemeinsamen Osteoblasten-ähnlichen Eigenschaften gehören z. B. die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Expression von Parathormon- und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Rezeptoren und die Synthese von Knochenmatrixproteinen, wie Collagen I, Proteoglykanen, BSP und BM-40 (McQuillan et al., 1995, Stanford et al., 1995). Als Mediumsupplemente zur Etablierung des Zellkulturmodells für die

mineralisierte Knochenmatrix wurde Ascorbinsäure zur Unterstützung der Collagensynthese und als Aktivator der Alkalischen Phosphatase (Leboy et al., 1989, Beck et al., 2000) hinzugegeben und β -Glycerophosphat als Substrat der alkalischen Phosphatase, die die Hydrolyse des Phosphats katalysiert und damit den Phosphatspiegel erhöht (Coelho et al., 2000).

Die Zugabe der Mediumsupplemente zu postkonfluent kultivierten SAOS-2 und UMR-108-Zellen führte zu einer Erhöhung des Calcium- und Phosphatspiegels in den Zellen und in der perizellulären Matrix im Vergleich zu nicht-supplementierten Zellen (s. Abb. 25, Abb. 26). Das molare Verhältnis von Calcium zu Phosphat in der Matrix lag bei 1,4 (UMR-108) bzw. 1,7 (SAOS-2), was mit Daten von Stanford et al. (1995), die ein molares Verhältnis von 1,53-1,74 für die Matrix der UMR-106 Zell-Linie berechnet haben, vergleichbar ist. Die UMR-108 Zell-Linie unterscheidet sich von der UMR-106 Zell-Linie nur durch die etwas verringerte Parathormon-Reaktivität (Partridge et al., 1983).

Bei den UMR-108 und SAOS-2 Zellen erfolgte die Bildung von Hydroxylapatitkristallen nur nach Supplementierung der Zellen mit β -Glycerophosphat. In normalem Medium kultivierte Zellen und unter Zugabe von Ascorbinsäure wurden keine Hydroxylapatitkristalle gebildet (s. Abb. 30). Zusätzlich haben Stanford et al. (1995) gezeigt, dass Hydroxylapatitkristalle in UMR-106-Kulturen auch nach Zugabe von anorganischem Phosphat gebildet werden und dass dieser Prozess ebenfalls unabhängig von der Zugabe von Ascorbinsäure erfolgt. Ultrastrukturelle Analysen haben gezeigt, dass mineralisierte Strukturen sowohl in der perizellulären Matrix als auch im Cytosol der UMR-106 Zellen vorkommen. Einige dieser Kristalle waren in der Nähe von Collagen-Fibrillen zu finden, waren aber selten mit diesen assoziiert. Die Hemmung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase inhibierte den Mineralisierungsprozess genauso wie die Zugabe verschiedener Antibiotika, die Transkriptions- und Translationsprozesse sowie die posttranslationalen Modifizierungen im Golgi-Apparat unterdrücken. Letztere Daten führten zu der Schlussfolgerung, dass die Neusynthese und korrekte Prozessierung von Proteinen für den Mineralisierungsprozess entscheidend ist. Diese Hypothese wurde durch ein Experiment unterstützt, bei dem in Anwesenheit von Cycloheximid die Zugabe von unter denaturierenden Bedingungen aus UMR-106 Zellen aufgereinigtem BSP zu keiner signifikanten Steigerung der Mineralisierung führte (Stanford et al., 1995). In dem gleichen UMR-106 in vitro-Modell der mineralisierten Knochenmatrix konnten Wang et al. (2000) zeigen, dass BSP zeitlich vor der Bildung von Hydroxylapatitkristallen außerhalb der Zellen detektierbar ist und später zum Teil mit den mineralisierten Bereichen kolokalisiert ist. Außerdem blockierte die Aktivierung der Protein-Kinase A durch transiente Parathormon-Zugabe oder durch Zugabe von nicht-hydrolysier-

baren cAMP-Analoga die Mineralisierung in einem nach Entfernung der Reagenzien reversiblen Prozess. BSP wurde unter diesen Bedingungen von den Zellen synthetisiert, ins Medium sekretiert, aber nicht in die extrazelluläre Matrix eingebaut, wofür eine Veränderung der Matrixzusammensetzung als Erklärung angenommen wurde (Wang et al., 2000).

Aufgrund der durch den Zweitantikörper verursachten Hintergrundfärbung konnte BSP in der perizellulären Matrix von UMR-108-Zellen mittels Immunfluoreszenz nicht detektiert werden. Bei dem SAOS-2 Zellkulturmodell gab es keine Hintergrundfärbung, BSP konnte aber trotzdem nur intrazellulär sowohl unter normalen als auch unter supplementierten Kulturbedingungen in zwei Wochen postkonfluenten Zellen detektiert werden (s. Abb. 28). McQuillan et al. (1995) konnten mittels Northern-Blot Analysen von SAOS-2 Zellen zeigen, dass das BSP-Transkript nur in postkonfluenten Kulturen zu finden war. Vor Erreichen der Konfluenz konnte keine BSP-mRNA detektiert werden. Die BSP-Expression war somit nur von der Zelldichte abhängig, wobei die Zugabe von Ascorbinsäure keine Veränderung hervorrief. Die Untersuchung der Zellkulturüberstände von SAOS-2 und UMR-108 Zellen mittels Immunoblot ergab unter normalen Mediumbedingungen ab der ersten postkonfluenten Woche Signale für BSP. In Anwesenheit von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure konnte kein BSP im Kulturüberstand detektiert werden (s. Abb. 29). Da die Bildung der Hydroxylapatitkristalle nur in Anwesenheit von β -Glycerophosphat erfolgte, wurde untersucht, ob das produzierte BSP unter diesen Bedingungen mit den Hydroxylapatitkristallen assoziiert und deshalb nicht im Kulturmedium detektierbar ist. Nach sequenzieller Extraktion von drei Wochen postkonfluent unter Zugabe von β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure kultivierten Zellen mit Gu-HCl (G1), EDTA (E) und Gu-HCl (G2) war BSP im Immunoblot erst nach EDTA-Extraktion detektierbar (s. Abb. 31). Je mehr Kristalle in den Kulturen vorhanden waren, desto mehr BSP konnte nach EDTA-Extraktion nachgewiesen werden (s. Abb. 30, Abb. 31). Diese Daten deuten darauf hin, dass das im Zellkulturüberstand nicht detektierbare BSP in die Hydroxylapatitkristalle eingeschlossen wird. In Analogie hierzu haben Kasugai et al. (1992) mittels einstündiger radioaktiver Markierung von Primärkulturen aus Schädelknochen der Ratte gezeigt, dass BSP nach 8 Stunden in den Zellen, dem Kulturmedium und dem G1-Extrakt nicht mehr detektierbar ist, gleichzeitig aber im E-Extrakt und im G2-Extrakt zunimmt. Mit einer vergleichbaren Extraktion von Röhrenknochen fötaler Schweine konnte gezeigt werden, dass die BSP-Menge in den E-Extrakten und G2-Extrakten mit zunehmender Dichte der extrahierten Knochenfragmente anstieg, während gleichzeitig eine Abnahme der BSP-Menge in den G1-Extrakten zu verzeichnen war (Sodek et al., 2000).

Da die hohe Affinität für Hydroxylapatit bereits mit nativem BSP aus Zellkulturüberständen von UMR-106 Zellen gezeigt werden konnte (Stubbs et al., 1997) wurde der von Stubbs (1996) aufgrund von vergleichenden Experimenten mit in Bakterien hergestellten rekombinanten BSP-Fragmenten postulierte Einfluss von posttranslationalen Modifizierungen auf die Bindungseigenschaften von BSP zu Hydroxylapatit untersucht. Dabei wurden verschiedene BSPs mit einem linearen Natriumphosphatgradienten von einer Hydroxylapatitsäule eluiert, wobei die für die Elution benötigte Phosphatkonzentration Rückschlüsse auf die Affinität des jeweiligen Proteins für Hydroxylapatit erlaubt. Das aus humanen Knochen isolierte BSP hatte die stärkste Affinität, gefolgt von rekombinantem BSP aus der Mammakarzinomzell-Linie MCF-7 und rekombinantem BSP aus der Nierenzell-Linie EBNA-293 (s. Abb. 32). Da die untersuchten BSPs eine identische Sequenz besitzen, sind unterschiedliche posttranslationale Modifikationen als Ursache für die verschiedenen Affinitäten zu Hydroxylapatit wahrscheinlich.

Die in dieser Arbeit und von anderen Arbeitsgruppen ermittelten Daten, wie die hohe Affinität von BSP zu Hydroxylapatit, die Nukleatoreigenschaften in Agarosegelsystemen, die Assoziation mit Hydroxylapatitkristallen und die zeitlich unmittelbar vor- oder gleichzeitig mit der Mineralisierung erfolgende BSP-Expression, sprechen für eine Funktion des Proteins als Nukleator für Hydroxylapatitkristalle bei der Mineralisierung der Knochenmatrix.

5.5 Welche Rolle spielt BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen?

Die spezifische Expression von BSP in und auf malignen Brustkrebszellen, der erhöhte Serumspiegel des Proteins und das mit beiden Parametern verbundene verstärkte Risiko der Knochenmetastasierung (Bellahcène et al., 1996 c, d, Diel et al., 1999) ist von großer klinischer Bedeutung. BSP wird aufgrund dieser Daten als Prognostikfaktor für die Knochenmetastasierung beim Mammakarzinom diskutiert. Die molekularen Ursachen hierfür sind noch unbekannt.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der verschiedenen Analysen zur Expression von BSP in und auf Brustkrebszell-Linien zusammengestellt.

Mamma- karzinom- zell-Linie	Immunoblot	Immunfluores- zenz	FACS	Nacktmaus- modell
	Überstände/ Lysate	Cytosol/ Zelloberfläche	% BSP-positive Zellen	Bildung von Knochenmetas- tasen (*)
MCF-7	- / -	+ / -	17% (+)	n. b.
MDA-MB-231	? / ?	+ / -	5% (-)	+
T47-D	- / ?	+ / +	37% (+)	n. b.
ZR75-1	- / -	+ / -	3% (-)	n. b.

Tab. 17: BSP-Expression von Brustkrebszell-Linien.

Zusammenstellung der mit verschiedenen immunologischen Methoden (Immunoblot, Immunfluoreszenz, FACS) erhaltenen BSP-Expressionsdaten sowie Daten zur Bildung von Knochenmetastasen (*) von Sasaki et al. (1995). Mit + sind positive BSP-Signale bezeichnet, ein – bedeutet kein Signal für BSP, mit ? sind schwache BSP-Signale oberhalb von 94 kDa bezeichnet und n. b. steht für nicht bestimmt. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der mit der FACS-Analyse unter Verwendung des monoklonalen BSP-Antikörpers ermittelten BSP-positiven Zellen angegeben.

Die mittels FACS ermittelten Daten (s. Abb. 34) stimmen überwiegend mit den Immunfluoreszenzdaten (s. Abb. 33) überein, wenn man eine FACS-Färbung von weniger als 5% als negativ für BSP wertet. Einzige Ausnahme war hierbei die MCF-7-Zell-Linie, deren Oberfläche in der Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper kein BSP-spezifisches Signal ergab, während mit dem gleichen Antikörper in der FACS-Analyse 17% BSP-positive Zellen und mit dem polyklonalen LF83-Antikörper 92% BSP-positive Zellen detektiert werden konnten (s. Tab. 16). Die von Bellahcène et al. (1996 a) ermittelten FACS-Daten wurden bestätigt. Danach konnte BSP intrazellulär in allen untersuchten Mammakarzinomzell-Linien gefunden werden. Während die Östrogenrezeptor-positiven Zell-Linien MCF-7 und T47-D zusätzlich BSP auf der Zelloberfläche exprimieren, konnte kein BSP auf der Zelloberfläche der Östrogenrezeptor-negativen Zell-Linie MDA-MB-231 und der Östrogenrezeptor-positiven Zell-Linie ZR75-1 detektiert werden. Das bedeutet, dass auch die BSP-Expression in Mammakarzinomzell-Linien unabhängig vom Östrogenrezeptorstatus erfolgt, was mit den in vivo Beobachtungen übereinstimmt (Bellahcène et al., 1996 d). Interessanterweise konnte mittels FACS-Analyse, genauso wie bei Bellahcène et al. (1996 a), gezeigt werden, dass immer nur ein Teil der Zellen BSP auf der Oberfläche exprimiert. Dieser prozentuale Anteil an BSP-positiven Zellen reduziert sich bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers im Vergleich zum polyklonalen LF83-Antikörper (s. Tab. 16). Im Gegensatz zu Bellahcène et al. (1996 a) konnte im Immunoblot trotz Verwendung gleicher Bedingungen keine prominente BSP-Bande oberhalb von 97 kDa detektiert werden.

Ob es sich bei den schwachen Signalen oberhalb von 94 kDa der MDA-MB-231- und T47-D-Lysate um BSP handelt, kann nicht eindeutig beantwortet werden, weil die publizierten Daten nicht reproduziert werden konnten. Somit ist die Frage nach der Größe des in Mammakarzinomzell-Linien exprimierten BSPs weiterhin unbeantwortet.

In Tabelle 17 ist das Ergebnis eines Experiments, bei dem man verschiedene Tumorzell-Linien in den linken Herzventrikel von Nacktmäusen injiziert hat und die Bildung von Knochenmetastasen 17 Tage nach Injektion mittels Röntgenaufnahmen verfolgt wurde, hinzugefügt. In diesem Nacktmausmodell verursachte die Injektion von MDA-MB-231 Zellen die Bildung von osteolytischen Knochenmetastasen (Sasaki et al., 1995). Auf der Oberfläche dieser Zell-Linie konnte mittels Immunfluoreszenz kein BSP detektiert werden. Die FACS-Analyse mit dem monoklonalen BSP-Antikörper und dem polyklonalen LF-83-Antikörper ergab einen Anteil von jeweils 5% BSP-positiven Zellen (s. Tab. 16). Bellahcène et al. (1996 a) konnten mittels FACS-Analyse unter Verwendung des polyklonalen LF83-Antikörpers kein BSP auf der Zelloberfläche der MDA-MB-231-Zellen detektieren. Diese Daten sprechen gegen die Hypothese, dass das BSP auf der Tumorzelloberfläche an der Bildung von Knochenmetastasen in diesem Nacktmausmodell beteiligt ist (Bellahcène et al., 1997 b, Waltregny et al., 2000). In vivo konnte BSP mittels immunohistochemischer Färbungen sowohl im Cytosol als auch auf Zelloberflächen von malignen Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Bellahcène et al., 1994). Die in vivo Expressionsdaten und die von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten kontroversen Ergebnisse bezüglich der BSP-Expression in und auf verschiedenen Mammakarzinomzell-Linien lassen die in vivo-Relevanz der Zellkulturexperimente fraglich erscheinen.

Von Meyer et al. (1998) wurde gezeigt, dass die Brustkrebszell-Linien MCF-7, MDA-MB-231, T47-D und ZR-75-1 $\alpha_v\beta_5$ Integrinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, während nur die MDA-MB-231-Zellen zusätzlich $\alpha_v\beta_3$ besitzen. In vivo konnten in normalem Brustgewebe, in Brusttumoren und in Knochenmetastasen nur $\alpha_v\beta_3$ Integrine gefunden werden (Liapis et al., 1996). Hierbei stellt sich die Frage, warum das von den MDA-MB-231 Zellen endogen exprimierte BSP nicht an die Integrine auf der Zelloberfläche bindet, obwohl es mit Hilfe seines Signalpeptids sekretiert werden sollte und im Zellkulturüberstand als schwache Bande mittels Immunoblot (s. Tab. 17) detektiert werden konnte?

Die Bindung der Mammakarzinomzell-Linien an rekombinantes BSP erfolgte unabhängig von der BSP-Expression auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 35) und somit auch unabhängig vom Östrogenrezeptorstatus der Zellen. Denaturiertes BSP hatte andere Zellbindungseigenschaften als das native Protein (s. Abb. 36). Die Adhäsion ist somit von der Ausbildung

einer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des BSPs abhängig. Deshalb sind Zelladhäsionsdaten, die mit BSP erhalten wurden, das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde (z. B. von Sung et al., 1998 b), kritisch zu bewerten.

Mit Hilfe einer Hydroxylapatitsäule konnte gezeigt werden, dass rekombinantes BSP aus MCF-7 Zellen eine Affinität für Hydroxylapatit hat, die nur knapp unterhalb der von aus Knochen isoliertem BSP liegt (s. Abb. 32). Dieses Ergebnis unterstützt zum einen die Hypothese, dass Tumorzellen, die sich in der Nähe von Mikrocalcifizierungen befinden eine erhöhte BSP-Expression zeigen, weil das Protein als Nukleator für die Bildung der Hydroxylapatitkristalle fungiert (Castronovo et al., 1998). Zum anderen spricht die Affinität des MCF-7-BSPs für Hydroxylapatit für die Hypothese, dass das Protein für die bevorzugte Anheftung von Brustkrebstumoren an den Knochen verantwortlich sein könnte (Bellahcène et al., 1997 b, Waltregny et al., 2000).

Bisher konnte gezeigt werden, dass BSP den malignen Tumorzellen Eigenschaften verleiht, die ihre bevorzugte Anheftung und Metastasierung im Knochen fördern können. Hierzu zählen die Affinität für Hydroxylapatit (s. Abb. 32), die Förderung der Angiogenese (Bellahcène et al., 2000) und der Schutz vor der Zerstörung durch das Komplementsystem nach Assoziation mit Faktor H (Fedarko et al., 2000). Das oben erwähnte Nacktmausmodell und die Tatsache, dass die BSP-Expression unabhängig vom Östrogenrezeptorstatus der Brustkrebszellen erfolgt (Bellahcène et al., 1996 d), Östrogenrezeptor-positive maligne Tumore aber mit höherer Wahrscheinlichkeit im Knochen metastasieren als Östrogenrezeptor-negative Tumore (Coleman et al., 1987), deutet auf die Komplexität des Mechanismus der Knochenmetastasierung von Brusttumorzellen hin. Nach Pagets "seed and soil" Hypothese ist die Umgebung des Organs, in dem Tumorzellen metastasieren, für deren Anheftung und Wachstum maßgeblich (Paget, 1889). Bei der Knochenmetastasierung von Brusttumorzellen sollen u. a. die im Knochen vorhandenen Wachstumsfaktoren und Cytokine, die beim Knochenumbau entstehenden Abbauprodukte sowie der Verlauf des Blutgefäßsystems (z. B. venöse Verbindungen vom Brusttumorgewebe zur Wirbelsäule und zum Schultergürtel) eine Rolle spielen (Berrettoni et al., 1986, Mundy, 1997).

Im Zusammenhang mit der Funktion von BSP beim Mammakarzinom und der Bildung von Knochenmetastasen sind u. a. noch folgende Fragen zu beantworten: Ist das BSP, das vom Mammakarzinomgewebe produziert wird, ursächlich mit der Knochenmetastasierung verbunden? Handelt es sich bei dem erhöhten BSP-Gehalt im Serum von Patientinnen um BSP, das vom Mammakarzinomgewebe selbst produziert und freigesetzt wird, um BSP, das sich noch auf der Tumorzelloberfläche befindet oder um BSP, das durch Mikro-

metastasierung aus dem Knochen freigesetzt wurde? Ist das BSP aus Knochen und aus Brusttumoren unterschiedlich?

Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. (1975). Calcification in human breast carcinomas: ultrastructural observations.
J. Pathol. **117**, 247-251.
- Arai, N., Ohya, K., Kasugi, S., Shimokawa, H., Ohida, S., Ogura, H., Amagasa, T. (1995).
Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced
by colchicine in rat tibial bone marrow cavity.
J. Bone Miner. Res. **10**, 1209-1217.
- Aubin, J.E., Gupta, A., Zirngibl, R., Rossant, J. (1995). Bone sialoprotein knockout mice have
bone abnormalities.
Bone **17**, 558, Abstract 3 a.
- Beck, G.R., Zerler, B., Moran, E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of
osteopontin gene expression.
PNAS **97**, 8352-8357.
- Bellahcène, A., Merville, M.P., Castronovo, V. (1994). Expression of bone sialoprotein, a
bone matrix protein, in human breast cancer.
Cancer Res. **54**, 2823-2826.
- Bellahcène, A., Antoine, N., Clausse, N., Tagliabue, E., Fisher, L.W., Kerr, J.M., Jarès, P.,
Castronovo, V. (1996 a). Detection of bone sialoprotein in human breast cancer tissue
and cell lines at both protein and messenger ribonucleic acid levels.
Lab. Invest. **75**, 203-210.
- Bellahcène, A., Van Riet, I., Antoine, N., Van Camp, B., Castronovo, V. (1996 b). Expression
of a bone matrix protein in myeloma cell lines.
Proc. Annu. Meet. Assoc. Cancer Res. **37**, A618 (abstract).
- Bellahcène, A., Menard, S., Bufalino, R., Moreau, L., Castronovo, V. (1996 c). Expression of
bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival.
Int. J. Cancer **69**, 350-353.
- Bellahcène, A., Kroll, M., Liebens, F., Castronovo, V. (1996 d). Bone sialoprotein expression
in primary human breast cancer is associated with bone metastases development.
J. Bone Miner. Res. **11**, 665-670.
- Bellahcène, A., Maloujahmoum, N., Fisher, L.W., Pastorino, H., Tagliabue, E., Ménard, S.,
Castronovo, V. (1997 a). Expression of bone sialoprotein in human lung cancers.
Calcif. Tissue Int. **61**, 183-188.
- Bellahcène, A., Castronovo, V. (1997 b). Expression of bone matrix proteins in human breast
cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone
metastases.
Bull. Cancer **84**, 17-24.
- Bellahcène, A., Albert, V., Pollina, L., Basolo, F., Fisher, L.W., Castronovo, V. (1998 a).
Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer.
Thyroid **8**, 637-641.

- Bellahcène, A., Albert, V., Nyabi, O., Cheung, N.-K.V., Kramer, K., Waltregny, D., Fisher, L.W., Castronovo, V. (1998 b). Bone sialoprotein is expressed in both human neuroblastoma tissues and cell lines.
Proc. Annu. Meet. Assoc. Cancer Res. **39**, 209 (abstract).
- Bellahcène, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N.S., Robey, F.A., Young, M.F., Fisher, L.W., Castronovo, V. (2000). Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis.
Circ. Res. **86**, 885-891.
- Bellows, C.G., Reimers, S.M., Heersche, J.N.M. (1999). Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D₃.
Cell. Tissue Res. **297**, 249-259.
- Benson, M.D., Bargeon, J.L., Yiao, G., Thomas, P.E., Kim, A., Cui, Y., Franceschi, R.T. (2000). Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression.
J. Biol. Chem. **275**, 13907-13917.
- Berghammer, H., Auer, B. (1993). "Easy-preps": fast and easy minipreparation for analysis of recombinant clones in E.coli.
Biotechniques **14**, 524-528.
- Berrettoni, B.A., Carter, J.R. (1986). Mechanisms of cancer metastasis to bone.
J. Bone Joint Surg. **68**, 308-312.
- Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D., Robey, P.G. (1991). Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues.
Calcif. Tissue Int. **49**, 421-426.
- Bianco, P., Riminucci, M., Bonucci, E., Termine, J.D., Robey, P.G. (1993 a). Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition.
J. Histochem. Cytochem. **41**, 183-191.
- Bianco, P., Riminucci, M., Silvestrini, G., Bonucci, E., Termine, J.D., Fisher, L.W., Robey, P.G. (1993 b). Localization of bone sialoprotein (BSP) to golgi and post-golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix.
J. Histochem. Cytochem. **41**, 193-203.
- Bigge, J.C., Patel, T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M., Parekh, R.B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid.
Anal. Biochem. **230**, 229-238.
- Bosshardt, D.D., Zalzal, S., McKee, M.D., Nanci, A. (1998). Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum.
The Anatom. Rec. **250**, 13-33.
- Brockhausen, I., Yang, J.M., Burchell, J., Whitehouse, C., Taylor-Papadimitriou, J. (1995). Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells.
Eur. J. Biochem. **233**, 607-617.
- Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells.
Biochim. Biophys. Acta **1473**, 67-95.

- Byzova, T.V., Kim, W., Midura, R.J., Plow, E.F. (2000). Activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein.
Exp. Cell Res. **254**, 299-308.
- Castronovo, V., Bellahcène, A. (1998). Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells.
Int. J. Oncol. **12**, 305-308.
- Chai, W., Hounsell, E., Cashmore, G.C., Rosankiewicz, J.R., Bauer, C.J., Feeney, J., Feizi, A.M., Lawson, A.M. (1992). Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. A combined mass spectrometry and ^1H -NMR-study.
Eur. J. Biochem. **203**, 257-268.
- Chen, J., Shapiro, H.S., Wrana, J.L., Reimers, S., Heersche, J.N.N., Sodek, J. (1991). Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by *in situ* hybridization.
Matrix **11**, 133-143.
- Chen, J., Shapiro, H.S., Sodek, J. (1992). Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues.
J. Bone Miner. Res. **7**, 987-997.
- Chen, J., McKee, M.D., Sodek, J. (1994). Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin.
Histochem. J. **26**, 67-78.
- Chen, J., Thomas, H.F., Sodek, J. (1996). Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat bone organ cultures.
Connect. Tissue Res. **34**, 41-51.
- Chen, J., Sasaguri, K., Sodek, J. (1998). Enamel epithelium express bone sialoprotein (BSP).
Eur. J. Oral. Sci. **106** (suppl. 1) 331-336.
- Chen, J., Jin, H., Ranly, D.N., Sodek, J., Boyan, B.D. (1999). Altered expression of bone sialoproteins in vitamin D-deficient rBSPLuc transgenic mice.
J. Bone Miner. Res. **14**, 221-229.
- Chen, Y., Bal, B.S., Gorski, J.P. (1992). Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone.
J. Biol. Chem. **267**, 24871-24878.
- Chenu, C., Delmas, P.D. (1992). Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human.
J. Bone Miner. Res. **7**, 47-54.
- Chenu, C., Ibraki, K., Gehron Robey, P., Delmas, P.D., Young, M.F. (1994). Cloning and sequence analysis of bovine bone sialoprotein cDNA: conservation of acidic domains, tyrosine sulfation consensus repeats, and RGD cell attachment domain.
J. Bone Miner. Res. **9**, 417-421.
- Coelho, M.J., Fernandes, M.H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation.
Biomaterials **21**, 1095-1102.

- Coleman, R.E., Rubens, R.D. (1987). The clinical course of bone metastases from breast cancer.
Br. J. Cancer **55**, 61-66.
- Cooper, L.F., Yliheikkilä, P.K., Felton, D.A., Whitson, S.W. (1998). Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation.
J. Bone Miner. Res. **13**, 620-632.
- Cowles, E.A., DeRome, M.E., Pastizzo, G., Brailey, L.L., Gronowicz, G.A. (1998). Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development.
Calcif. Tissue Int. **62**, 74-82.
- Di Cesare, P.E., Hauser, N., Lehmann, D., Pasumarti, S., Paulsson, M. (1994). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon.
FEBS Lett. **354**, 237-240.
- Diel, I.J., Solomayer, E.F., Seibel, M.J., Pfeilschifter, J., Maisenbacher, H., Gollan, C., Pecherstorfer, M., Conradi, R., Kehr, G., Boehm, E., Armbruster, F.P., Bastert, G. (1999). Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis.
Clin. Cancer. Res. **5**, 3914-3919.
- Ecarot-Charrier, B., Bouchard, F., Delloye, C. (1989). Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate.
J. Biol. Chem. **264**, 20049-20053.
- Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegård, D., Andersson, G. (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase.
J. Biol. Chem. **269**, 14853-14856.
- Endo, Y., Yamashita, K., Tachibana, Y., Tojo, S., Kobata, A. (1979). Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin.
J. Biochem. **85**, 669-679.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rhode, H., Timpl, R. (1981). Shapes, domain organisation and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix.
J. Mol. Biol. **150**, 97-120.
- Engel, J., Furthmayr, H. (1987). Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen type IV, collagen type VI, and proteoglycans.
Methods Enzymol. **145**, 3-78.
- Fedarko, N.S., Fohr, B., Robey, P.G., Young, M.F., Fisher, L.W. (2000). Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack.
J. Biol. Chem. **275**, 16666-16672.
- Fisher, L.W., Whitson, S.W., Avioli, L.V., Termine, J.D. (1983). Matrix sialoprotein of developing bone.
J. Biol. Chem. **258**, 12723-12727.

- Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N., Termine, J.D. (1987). Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone.
J. Biol. Chem. **262**, 9702-9708.
- Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J.D., Young, M.F. (1990). Human Bone Sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization.
J. Biol. Chem. **265**, 2347-2351.
- Flores, M.E., Norgard, M., Heinegård, D., Reinholt, F.P., Andersson, G. (1992). RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin.
Exp. Cell Res. **201**, 536-530.
- Flores, M.E., Heinegård, D., Reinholt, F.P., Andersson, G. (1996). Bone sialoprotein coated on glass and plastic surfaces is recognized by different β_3 integrins.
Exp. Cell Res. **227**, 40-46.
- Franzén, A., Heinegård, D. (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix.
Biochem. J. **232**, 715-724.
- Fujisawa, R., Koboki, Y. (1992). Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils.
Calcif. Tissue Int. **51**, 438-442.
- Fujisawa, R., Nodasaka, Y., Kuboki, Y. (1995). Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen.
Calcif. Tissue Int. **56**, 140-144.
- Fujisawa, R., Mizuno, M., Nodasaka, Y., Kuboki, Y. (1997). Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu₇-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein.
Matrix Biol. **16**, 21-28.
- Fukuda, M., Hindsgaul, O. (1994). *Molecular Glycobiology*. Oxford University Press.
- Galasko, C.S.B. (1969). The detection of skeletal metastases from mammary cancer by gamma camera scintigraphy.
Br. J. Surg. **56**, 757-764.
- Gill, S.C., Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.
Anal. Biochem. **182**, 319-326.
- Gillespie, M.T., Thomas, R.J., Pu, Z.Y., Zhou, H., Martin, T.J., Findlay, D.M. (1997). Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers.
Int. J. Cancer **73**, 812-815.
- Goldberg, H.A., Warner, K.J., Stillman, M.J., Hunter, G.K. (1996). Determination of the hydroxyapatite-nucleating region of bone sialoprotein.
Connect. Tissue Res. **35**, 385-392.

- Gooley, A.A., Williams, K.L. (1994). Towards characterizing O-glycans: the relative merits of *in vivo* and *in vitro* approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites.
Glycobiology **4**, 413-417.
- Grzesik, W.J., Robey, P.G. (1994). Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro.
J. Bone Miner. Res. **9**, 487-496.
- Haagensen, C.D. (1974). The choice of treatment for operable carcinoma of the breast.
Surgery **76**, 685-714.
- Hakamori, S.I. (1981). Blood group ABH and Ii antigens on human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change.
Semin. Hematol. **178**, 39.
- Hansen, J.E., Lund, O., Engelbrecht, J., Bohr, H., Nielsen, J.O., Hansen, J.E.S., Brunak, S. (1995). Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase.
Biochem. J. **308**, 801-813.
- Hansen, J.E., Lund, O., Rapacki, K., Brunak, S. (1997). O-GLYCBASE version 2.0: a revised database of O-glycosylated proteins.
Nucl. Acids Res. **25**, 278-282.
- Hansen, J.E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A.A., Williams, K.L., Brunak, S. (1998). NetOGlyc: Prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility.
Glycoconj. J. **15**, 115-130.
- Hanski, C., Hanisch, F.G., Riecken, E.O. (1992). Alteration of mucin bound carbohydrate moieties in malignant transformation of colonic mucosa.
Cancer J. **5**, 332.
- Heinegård, D., Hultenby, K., Oldberg, A., Reinholt, F., Wendel, M. (1989 a). Macromolecules in bone matrix.
Connect. Tissue Res. **21**, 3-14.
- Heinegård, D., Oldberg, A. (1989 b). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules.
FASEB J. **3**, 2042-2051.
- Helfrich, M.H., Nesbitt, S.A., Dorey, E.L., Horton, M.A. (1992). Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via beta 3 integrin.
J. Bone Miner. Res. **7**, 335-43.
- Hermentin, P., Witzel, R., Kanzy, E.J., Diderrich, G., Hoffmann, D., Metzner, H., Vorlop, J., Haupt, H. (1996). The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation.
Glycobiol. **6**, 217-230.
- Herring, G.M. (1972). The biochemistry and physiology of bone (Bourne, G.H., ed), Academic Press, New York, Vol I, 127-189.

- Hoffman, H.C., Marty, R. (1972). Bone scanning. Its value in the preoperative evaluation of patients with suspicious breast masses.
Am. J. Surg. **124**, 194-199.
- Horton, W.A. (1993). Morphology of connective tissue: cartilage.
Connective tissue and its heritable disorders 73-84.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C., Feizi, T. (1985). Structural analysis of the O-glycosidically linked core region of oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofetal antigens.
Eur. J. Biochem. **148**, 367-377.
- Hultenby, K., Reinholt, F.P., Norgard, M., Oldberg, A., Wendel, M., Heinegård, D. (1994). Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin.
Eur. J. Cell Biol. **63**, 230-239.
- Hunter, G.K., Goldberg, H.A. (1993). Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8562-8565.
- Hunter, G.K., Goldberg, H.A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.
Biochem. J. **302**, 175-179.
- Ibraki, K., Termine, J.D., Whitson, S.W., Young, M.F. (1992). Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts.
J. Bone Miner. Res. **7**, 743-754.
- Ingram, R.T., Clarke, B.L., Fisher, L.W., Fitzpatrick, L.A. (1993). Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity.
J. Bone Miner. Res. **8**, 1019-1029.
- Ivanov, B., Grzesik, W., Robey, F.A., (1995). Synthesis and use of a new bromoacetyl-derivatized heterotrifunctional amino acid for conjugation of cyclic RGD-containing peptides derived from human bone sialoprotein.
Bioconjugate Chem. **6**, 269-277.
- Karmatschek, M., Maier, I., Seibel, M.J., Woitge, H.W., Ziegler, R., Armbruster, F.P. (1997). Improved purification of bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay.
Clin. Chem. **43**, 2076-2082.
- Kasugai, S., Nagata, T., Sodek, J. (1992). Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro.
J. Cell. Physiol. **152**, 467-477.
- Kelm, R.J.Jr., Mann, K.G. (1990). Human platelet osteonectin: release, surface expression, and partial characterization.
Blood **75**, 1105-1113.
- Kelm, R.J.Jr., Mann, K.G. (1991). The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation.
J. Biol. Chem. **266**, 9632-9639.

- Kelm, R.J.Jr., Hair, G.H., Mann, K.G., Grant, B.W. (1992). Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC). *Blood* **80**, 3112-3119.
- Kerr, J.M., Fisher, L.W., Termine, J.D., Wang, M.G., McBride, O.W., Young, M.F. (1993). The human bone sialoprotein gene (IBSP): genomic localization and characterization. *Genomics* **17**, 408-415.
- Ki, J.J., Kim, R.H., Zhang, Q., Ogata, Y., Sodek, J. (1998). Characteristics of vitamin D3 receptor (VDR) binding to the vitamin D response element (VDRE) in rat bone sialoprotein gene promoter. *Eur. J. Oral. Sci.* **106**, Suppl. 1, 408-417.
- Kim, R.H., Shapiro, H.S., Li, J.J., Wrana, J.L., Sodek, J. (1994). Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence. *Matrix Biol.* **14**, 31-40.
- Kim, R.H., Li, J.J., Ogata, Y., Yamauchi, M., Freedman, L.P., Sodek, J. (1996). Identification of a vitamin D₃-response element that overlaps a unique inverted TATA box in the rat bone sialoprotein gene. *Biochem. J.* **318**, 219-226.
- Kim, R.H., Sodek, J. (1999). Transcription of the bone sialoprotein gene is stimulated by v-Src acting through an inverted CCAAT-box. *Cancer Res.* **59**, 565-571.
- Kinne, R.W., Fisher, L.W. (1987). Keratan sulfate proteoglycan in rabbit compact bone is bone sialoprotein II. *J. Biol. Chem.* **262**, 10206-10211.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., Timpl, R. (1997). Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kurosaka, A., Nakajima, H., Funakoshi, M., Matsuyama, T., Nagayo, T., Yamashina, I. (1983). Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **258**, 11594-11598.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larsson, E., Mussener, A., Heinegård, D., Klareskog, L., Saxne, T. (1997). Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in rats with collagen arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 1258-1261.
- Leboy, P.S., Vaia, L., Uschmann, B., Golub, E., Adams, S.L., Pacifici, M. (1989). Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 17281-17286.

- Li, J., Quilty, J., Popov, M., Reithmeier, R.A. (2000). Processing of N-linked oligosaccharide depends on its location in the anion exchanger, AE1, membrane glycoprotein. *Biochem. J.* **349**, 51-57.
- Liapis, H., Flath, A., Kitazawa, S. (1996). Integrin $\alpha_v\beta_3$ expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn. Mol. Path.* **5**, 127-135.
- Lohmander, L.S., Saxne, T., Heinegård, D. (1996). Increased concentrations of bone sialoprotein in joint fluid after knee injury. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 622-626.
- Marshall, R.D. (1972). Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 673-702.
- McQuillan, D.J., Richardson, M.D., Bateman, J.F. (1995). Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone* **16**, 415-426.
- Meyer, T., Marshall, J.F., Hart, I.R. (1998). Expression of α_v integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **77**, 530-536.
- Midura, R.J., McQuillan, D.J., Benham, K.J., Fisher, L.W., Hascall, V.C. (1990). A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.* **265**, 5285-5291.
- Midura, R.J., Hascall, V.C. (1996). Bone sialoprotein-a mucin in disguise? *Glycobiol.* **6**, 677-681.
- Mintz, K.P., Grzesik, W.J., Midura, R.J., Robey, P.G., Termine, J.D., Fisher, L.W. (1993). Purification and fragmentation of nondenatured bone sialoprotein: Evidence for a cryptic, RGD-resistant cell attachment domain. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 985-995.
- Mintz, K.P., Fisher, L.W., Grzesik, W.J., Hascall, V.C., Midura, R.J. (1994). Chlorate-induced inhibition of tyrosine sulfation on bone sialoprotein synthesized by a rat osteoblast-like cell line (UMR 106-01 BSP). *J. Biol. Chem.* **269**, 4845-4852.
- Mizuno, M., Imai, T., Fujisawa, R., Tani, H., Koboki, Y. (2000). Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. *Calcif. Tissue Int.* **66**, 388-396.
- Müller, S., Hanisch, F.G. (2000). O-glycan profiling of MUC1 fusion proteins in mammary carcinoma cell lines. Mucins in health and disease. 6th international workshop on carcinoma-associated mucins. Cambridge, UK.
- Mundy, G.R. (1997). Mechanisms of bone metastasis. *Cancer Suppl.* **80**, 1546-1556.

- Nefussi, J.R., Bami, G., Modrowski, D., Oboeuf M., Forest, N. (1997). Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*.
J. Histochem. Cytochem. **45**, 493-503.
- Nehrke, K., Hagen, F.K., Tabak, L.A. (1996). Charge distribution of flanking amino acids influence O-glycan acquisition *in vivo*.
J. Biol. Chem. **271**, 7061-7065.
- Ogata, Y., Niisato, N., Furuyama, S., Cheifetz, S., Kim, R.H., Sugiya, H., Sodek, J. (1997). Transforming growth factor-beta 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF-beta activation element in the rat BSP gene promoter.
J. Cell. Biochem. **65**, 501-512.
- Ogata, Y., Nakao, S., Kim, R.H., Li, J.J., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J. (2000). Parathyroid hormone regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription is mediated through a pituitary-specific transcription factor-1 (Pit-1) motif in the rat BSP gene promoter.
Matrix Biol. **19**, 395-407.
- Ohno, U., Matsuyama, T., Ishii, S., Hata, H., Kuboki, Y. (1995). Measurement of human serum immunoreactive bone sialoprotein (BSP) in normal adults and in pregnant women.
J. Bone Miner. Res. **10** (Suppl 1), 476, abstract T489.
- Oldberg, A., Franzén, A., Heinegård, D., Pierschbacher, M., Ruoslahti, E. (1988 a). Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells.
J. Biol. Chem. **263**, 19433-19436.
- Oldberg, A., Franzén, A., Heinegård, D. (1988 b). The primary structure of a cell binding bone sialoprotein.
J. Biol. Chem. **263**, 19430-19432.
- Oldberg, A., Jirskog-Hed, B., Axelsson, S., Heinegård, D. (1989). Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones.
J. Cell. Biol. **109**, 3183-3186.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., Redmond, J.W. (1998). A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins.
Glycoconj. J. **15**, 737-747.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast.
Lancet. **1**, 571-573.
- Partridge, N.C., Alcorn, D., Michelangeli, V.P., Ryan, G., Martin, J. (1983). Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin.
Cancer Res. **43**, 4308-4314.
- Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A., Parekh, R. (1993). Use of Hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins.
Biochemistry **32**, 679-693.
- Poser, J.W., Esch, F.S., Ling, N.C., Price, P.A. (1980). Isolation and sequence of the vitamin k-dependent protein from human bone.
J. Biol. Chem. **255**, 8685-8691.

- Provencher, S.W., Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism.
Biochemistry **20**, 33-37.
- Raynal, C., Delmas, P.D., Chenu, D. (1996). Bone sialoprotein stimulates *in vitro* bone resorption.
Endocrinology **137**, 2347-2354.
- Roach, H.I. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption.
Cell Biol. Int. **18**, 617-628.
- Roche, P., Goldberg, H.A., Delmas, P.D., Malaval, L. (1999). Selective attachment of osteoprogenitors to laminin.
Bone **24**, 329-336.
- Romeis, B. (1989). Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg, 17. Auflage.
- Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farach-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L., Cheresch, D.A. (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ potentiate bone resorption.
J. Biol. Chem. **268**, 9901-9907.
- Rydén, C., Maxe, I., Franzén, A., Ljungh, A., Heinegård, D., Rubin, C. (1987). Selective binding of a bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. A possible mechanism for specific tissue localization.
Lancet. **2**, 515.
- Rydén, C., Yacoub, A., Maxe, I., Heinegård, D., Oldberg, A., Franzén, A., Ljungh, A., Rubin, K. (1989). Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis.
Eur. J. Biochem. **184**, 331-336.
- Rydén, C., Yacoub, A., Hirsch, G., Wendel, M., Oldberg, A., Ljungh, A. (1990). Binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus epidermidis* isolated from a patient with chronic recurrent multifocal osteomyelitis.
J. Infect. Dis. **161**, 814-815.
- Rydén, C., Tung, H., Nikolaev, V., Engström, A., Oldberg, A. (1997). *Staphylococcus aureus* causing osteomyelitis binds to a nonapeptide sequence in bone sialoprotein.
Biochem. J. **327**, 825-829.
- Salih, E., Zhou, H.Y., Glimcher, M.J. (1996). Phosphorylation of purified bovine bone sialoprotein and osteopontin by protein kinases.
J. Biol. Chem. **271**, 16897-16905.
- Sasaguri, K., Chen, L. (1996). Direct submission to GenBank Accession number U65889.
- Sasaki, A., Boyce, B.F., Story, B., Wright, K.R., Chapman, M., Boyce, R., Mundy, G.R., Yoneda, T. (1995). Bisphosphonate Risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice.
Cancer Res. **55**, 3551-3557.

- Saxne, T., Zunino, L., Heinegård, D. (1995). Increased release of bone sialoprotein into fluid reflects tissue destruction in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. **38**, 82-90.
- Schachter, H., Williams, D. (1982). Biosynthesis of mucus glycoproteins.
Adv. Exp. Med. Biol. **144**, 3-28.
- Schenk, R.K., Felix, R., Hofstetter, W. (1993). Morphology of connective tissue: bone. Connective tissue and its heritable disorders 85-101.
- Segat, D. (1999). Expression of monomeric and trimeric recombinant matrilin 1 and analysis of its role in the cartilage.
Dissertation, Universität zu Köln.
- Seibel, M.J., Woitge, H.W., Pecherstorfer, M., Karmatschek, M., Horn, E., Ludwig, H., Armbruster, F.P., Ziegler, R. (1996). Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **81**, 3289-3294.
- Sharp, J.A., Sung, V., Slavin, J., Thompson, E.W., Henderson, M.A. (1999). Tumor cells are the source of osteopontin and bone sialoprotein expression in human breast cancer.
Lab. Invest. **79**, 869-877.
- Sklaroff, D.M., Charkes, N.D. (1968). Bone metastases from breast cancer at the time of radical mastectomy.
Surg. Gynecol. Obstet. **127**, 763-768.
- Sodek, J., Li, J.J., Ogata, Y., Yamaouchi, M. (1996). Characterization of the bone sialoprotein (BSP) gene promoter.
Connect. Tissue Res. **25**, 23-31.
- Sodek, K.L., Tupy, J.H., Sodek, J., Grynpas, M.D. (2000). Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria.
Bone **26**, 189-198.
- Somerman, M.J., Sauk, J.J., Foster, R.A., Norris, K., Dickerson, K., Argraves, W.S. (1991). Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum.
J. Periodontal. Res. **26**, 10-6.
- Somerman, M.J., Fisher, L.W., Foster R.A., Sauk, J.J. (1998). Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro.
Calcif. Tissue Int. **43**, 50-53.
- Sommarin, Y., Larsson, T., Heinegård, D. (1989). Chondrocyte-matrix interactions, attachment to proteins isolated from cartilage.
Exp. Cell Res. **184**, 181-192.
- Sommer, B., Bickel, M., Hofstetter, W., Wetterwald, A. (1996). Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues.
Bone **19**, 371-380.
- Stanford, C.M., Jacobsen, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J. (1995). Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP).
J. Biol. Chem. **270**, 9420-9428.

- Staudacher, E., Altmann, F., Wilson, I.B.H., März, L. (1999). Fucose in N-glycans: from plant to man.
Biochim. Biophys. Act. **1473**, 216-236.
- Stubbs III, J.T. (1996). Generation and use of recombinant human bone sialoprotein and osteopontin for hydroxyapatite studies.
Connect. Tissue Res. **35**, 393-399.
- Stubbs III, J.T., Mintz, K.P., Eanes, E.D., Torchia, D.A., Fisher, L.W. (1997). Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: Delineation of the mineral binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain.
J. Bone Miner. Res. **12**, 1210-1222.
- Sung, V., Azumi, N., Fisher, L.W., Murray, A., Aaron, A.D., Thompson, E.W. (1998 a). Bone sialoprotein transfection stimulates human breast cancer cell migration.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **39**, 209, abstract 1427.
- Sung, V., Stubbs III, J.T., Fisher, L.W., Aaron, A.D., Thompson, E.W. (1998 b). Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential use of the $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ Integrins.
J. Cell. Physiol. **176**, 482-494.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Philajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (2000). Mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II and IX.
J. Biol. Chem. in press.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci USA. **76**, 4350-4354.
- Tung, H., Guss, B., Hellmann, U., Persson, L., Rubin, K., Rydén, C. (2000). A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal SDR family.
Biochem. J. **345**, 611-619.
- Van der Pluijm, G., Mouthaan, H., Baas, C., De Groot, H., Papapoulos, S., Löwik, C. (1994). Integrins and osteoclast resorption in three bone organ cultures: Differential sensitivity to synthetic Arg-Gly-Asp peptides during osteoclast formation.
J. Bone Miner. Res. **9**, 1021-1028.
- Van der Pluijm, G., Vloedgraven, H.J.M., Ivanov, B., Robey, F.A., Grzesik, W.J., Robey, P.G., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W.G.M. (1996). Bone sialoprotein peptides are potent inhibitors of breast cancer cell adhesion to bone.
Cancer Res. **56**, 1948-1955.
- Van Halbeek, H., Strang, A.M., Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G., Roussel, P. (1994). Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le^{a+b}) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure.
Glycobiology, **2**, 203-219.

- Waltregny, D., Bellahcène, A., Van Riet, I., Fisher, L.W., Young, M., Fernandez, P., Dewé, W., de Laval, J., Castronovo, V. (1998). Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer.
J. Natl. Cancer Inst. **90**, 1000-1008)
- Waltregny, D., Bellahcène, A., de Leval, X., Florkin, B., Weidle, U., Castronovo, V. (2000). Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers.
J. Bone Miner. Res. **15**, 834-843.
- Wang, A., Martin, J.A., Lembke, L.A., Midura, R.J. (2000). Reversible suppression of *in vitro* biomineralization by activation of protein kinase A.
J. Biol. Chem. **275**, 11082-11091.
- Whitson, S.W., Whitson, M.A., Bowers, D.E., Falk, M.C. (1992). Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine bone cells grown in vitro.
J. Bone Miner. Res. **7**, 727-741.
- Woitge, H.W., Seibel, M.J., Ziegler, R. (1993). Knochenstoffwechsel: Biochemie und klinisch-chemische Diagnostik.
DG Klinische Chemie Mitteilungen 24, 309-331.
- Woitge, H.W., Pecherstorfer, M., Li, Y., Keck, A.V., Horn, E., Ziegler, R., Seibel, M.J. (1999). Novel serum markers of bone resorption: Clinical assessment and comparison with established urinary indices.
J. Bone Miner. Res. **14**, 792-801.
- Yacoub, A., Kindahl, P., Rubin, K., Wendel, M., Heinegård, D., Rydén, C. (1994). Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*.
Eur. J. Biochem. **222**, 919-925.
- Yamaouchi, M., Ogata, Y., Kim, R.H., Li, J.J., Freedman, L.P., Sodek, J. (1996). AP-1 regulation of the rat bone sialoprotein gene transcription is mediated through a TPA response element within a glucocorticoid response unit in the gene promoter.
Matrix. Biol. **15**, 119-130.
- Yamashita, K., Kamerling, J.P., Kobota, A. (1982). Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid.
J. Biol. Chem. **257**, 12809-12814.
- Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S., Kobata, A. (1984). Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis.
J. Biol. Chem. **259**, 834-840.
- Yang, R., Gotoh, Y., Moore, M.A., Rafidi, K., Gerstenfeld, L.C. (1995). Characterization of an avian bone sialoprotein (BSP) cDNA: comparisons to mammalian BSP and identification of conserved structural domains.
J. Bone Miner. Res. **10**, 632-640.
- Yao, K.L., Todescan, Jr., R., Sodek, J. (1994). Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture.
J. Bone Miner. Res. **9**, 231-240.

- Yazawa, S., Abbas, S.A., Madiyalakan, R., Barlow, J.J., Matta, K.L. (1986). N-Acetyl- β -D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarian tissue.
Carbohydr. Res. **149**, 241-252.
- Young, M.F., Ibraki, K., Kerr, J.M., Lyu, M.S., Kozak, C.A. (1994). Murine bone sialoprotein (BSP): cDNA cloning, mRNA expression, and genetic mapping.
Mam. Genome **5**, 108-111.
- Zhang, Q., Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Wrana, J.L., Sodek, J. (1990). Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein.
J. Biol. Chem. **265**, 7583-7589.
- Zhou, H.Y., Takita, H., Fujisawa, R., Mizuno, M., Kuboki, Y. (1995). Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells.
Calcif. Tissue Int. **56**, 403-407.

Abkürzungsverzeichnis

2-AB	2-Aminobenzamid
ACN	Acetonitril
BCA	Bicinchoninic acid
BM-40	Basalmembranprotein mit dem Molekulargewicht 40 kDa
BSP	Bone Sialoprotein
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTAF	Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein
EBNA	ebstein barr virus nuclear antigen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Enterokinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FX	Faktor X
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GE	Glukoseeinheiten
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GST	Glutathion-S-Transferase
Gu-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
his ₆	sechs aufeinanderfolgende Histidinreste
HRP	horseradish-peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktosid
m AK	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry
MEM	minimum essential medium
myc	Myelocytomatose
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NTA	Nitrilotracetic acid
p AK	polyklonaler Antikörper
PSD	post-source-decay
r BSP	rekombinantes BSP
TCA	Trichloracetic acid
TFA	Trifluoracetic acid
UTR	untranslatierte Region

Anhang

Sequenzen der in den pCEP-Pu Expressionsvektor einklonierten Elemente

```
aagcttctgctgcccgcctgctgctgcccactgaggggtcccagcaccatgagggcctg
                                     M R A W -

gatcttctttctcctttgctggccgggagggctctggcagccccgctagttcatcatca
I F F L L C L A G R A L A A P L V H H H -

tcatcatcatgggtccgctagttgacgtcggcagcaatgaacaaaaactcatctcagaaga
H H H G P L V D V A S N E Q K L I S E E -

ggatctggctagttatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacga
D L A S M T G G Q Q M G R D L Y D D D D -

taagctagcc
K↑ L A
```

Appendix 1: BM-40 SP-his₆-myc-EK.

In der oberen Reihe ist die Nukleotidsequenz in kleinen Buchstaben angegeben. Darunter ist die entsprechende Aminosäuresequenz in großen Buchstaben aufgeführt. Restriktionsschnittstellen und Startcodons sind fett gedruckt (*Hind* III: aagctt, *Nhe* I: gctagc, zerstörte *Nhe* I Schnittstelle: gctagt). Die verschiedenen Elemente sind folgendermaßen gekennzeichnet: BM-40 untranslatierte Region, BM-40 Signalpeptid, GST, his₆, myc, Abstandshalter, EK, FX, ↑ Schnittstellen der Proteasen.

```
aagcttctgctgcccgcctgctgctgcccactgaggggtcccagcaccatgagggcctg
                                     M R A W -

gatcttctttctcctttgctggccgggagggctctggcagccccgctagttcatcatca
I F F L L C L A G R A L A A P L V H H H -

tcatcatcatgggtccgctagttgacgtcggcagcaatgaacaaaaactcatctcagaaga
H H H G P L V D V A S N E Q K L I S E E -

ggatctggctagttatgactggtggacagcaaatgggtcgggatatcgaaaggtcgtggggc
D L A S M T G G Q Q M G R D I E G R↑ G A

tagc
S
```

Appendix 2: BM-40 SP-his₆-myc-FX. Erläuterungen s. Appendix 1.

```

aagcttctgcctgccgcctgcctgcctgccactgaggggtcccagcaccatgaggcctg
                                     M R A W -
gatcttctttctcctttgcctggccgggagggctctggcagccccgctagttatgtcccc
I F F L L C L A G R A L A A P L V M S P -
tatactaggttatttggaaaattaagggccttgtgcaaccactcgaacttcttttqgaata
I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y -
tcttgaagaaaaatatgaagagcattttgtatgagcgcgatgaaggtgataaatggcgaaa
L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W R N -
caaaaagtttgaattgggtttggaagtttcccaatcttccttattatattgatggtgatgt
K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V -
taaattaacacagtcttatggccatcatatagctgacaaqcacaaacatgttggg
K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G -
tggttgtccaaaagagcgtgcagagattttcaatgcttgaaggagcggttttggatattag
G C P K E R A E I S M L E G A V L D I R -
atacgggtgtttcgagaattgcatatagtaaaagactttgaaactctcaaagttgattttct
Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L -
taqcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcgaagatcgtttatgtcataaaacatatatt
S K L P E M L K M F E D R L C H K T Y L -
aaatggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgttgatgacgctcttgatgttgtttt
N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L -
atacatggacccaatgtgcctggatgcgttcccaaaattagtttgttttaaaaaacgtat
Y M D P M C L D A F P K L V C F K K R I -
tgaagctatcccacaaattgataaagtacttgaaatccagcaagtatatagcatggccttt
E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L -
gcagggctggcaagccacgtttggtggtggcgaccatcctccaaaagctagttatgactgg
Q G W Q A T F G G G D H P P K A S M T G -
tggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataagctagcc
G Q Q M G R D L Y D D D D K↑ L A -

```

Appendix 3: BM-40 SP-GST-EK. Erläuterungen s. Appendix 1.

aagcttctgcctgccgcctgcctgcctgccactgaggggttcccagcaccatgaggcctg
M R A W -

gatcttctttctcctttgcctggccgggagggctctggcagccccgctagttatgtcccc
I F F L L C L A G R A L A A P L V M S P -

tatactaggttatttggaaaattaagggccttgtgcaaccactcgaacttcttttqgaata
I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y -

tcttgaagaaaaatatgaagagcattttgtatgagcgcgatgaaggtgataaatggcgaaa
L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W R N -

caaaaagtttgaattgggtttggaqtttcccaatcttccttattatattgatggtgatgt
K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V -

taaattaacacagtctatggccatcatacgttatatagctgacaaqcacaaacatgttggg
K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G -

tggttgtccaaaagagcgtgcagagattttcaatgcttgaaggagcggttttggatattag
G C P K E R A E I S M L E G A V L D I R -

atacgggtgtttcgagaattgcatatagtaaaagactttgaaactctcaaagttgattttct
Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L -

tagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcgaagatcgtttatgtcataaaacatatatt
S K L P E M L K M F E D R L C H K T Y L -

aaatggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgttgatgacgctcttgatgttgtttt
N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L -

atacatggacccaatgtgcctggatgcgttcccaaaattagtttgttttaaaaaacgtat
Y M D P M C L D A F P K L V C F K K R I -

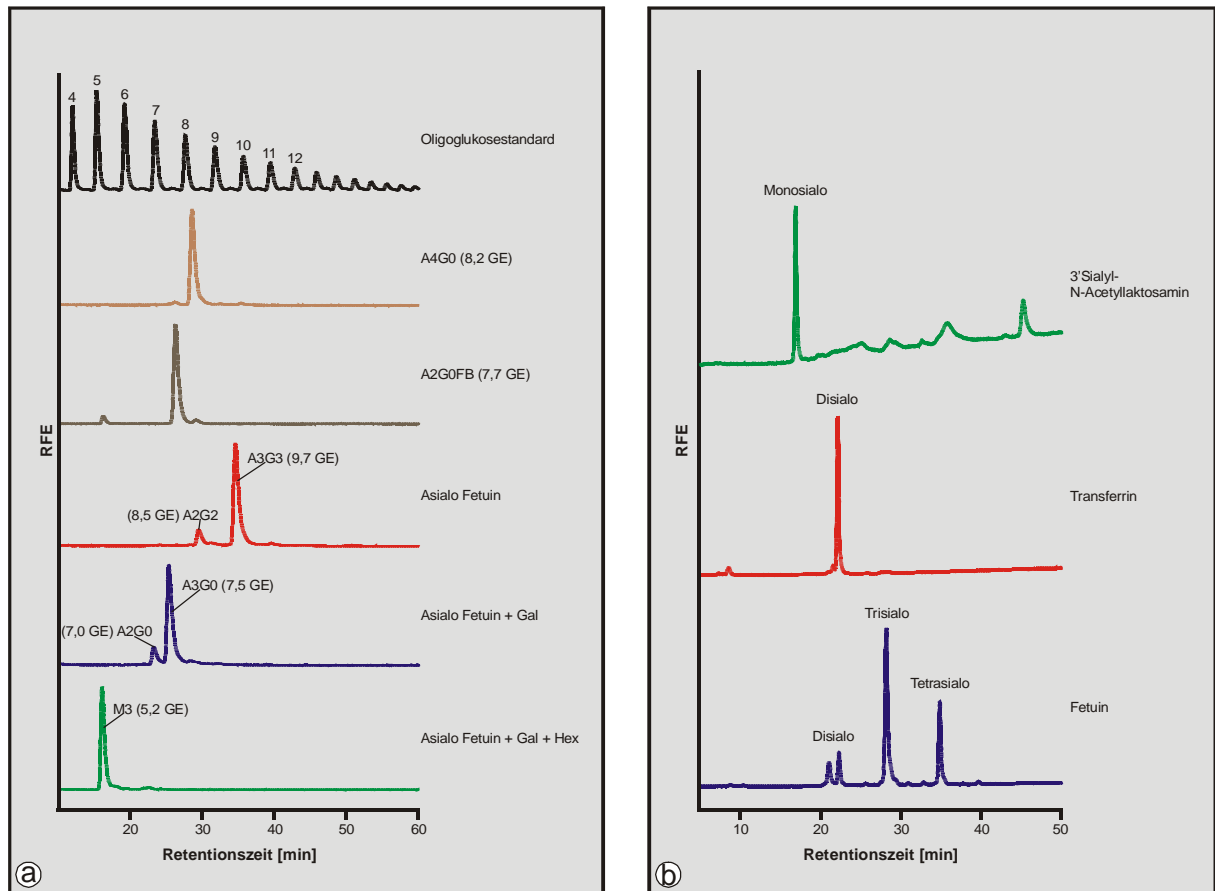
tgaagctatcccacaaattgataaqtacttgaaatccagcaagtatatagcatggccttt
E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L -

gcagggctggcaagccacgtttggtggtggcgaccatcctccaaaatcggatctgatcga
Q G W Q A T F G G G D H P P K S D L I E

aggtcgtgggggctagc
G R↑ G A S

Appendix 4: BM-40 SP-GST-FX. Erläuterungen s. Appendix 1.

HPLC-Profile der Standard N-Glykane



Appendix 5: Chromatogramme der Standard N-Glykane.

Asialo N-Glykane wurden mittels NP-HPLC (a) aufgetrennt. Die Anzahl der vom Oligoglucosestandard abgeleiteten Glukoseeinheiten ist für die kommerziellen Standards und für die durch sequenziellen Verdau mit verschiedenen Glykosidasen (β -Galaktosidase (Gal), β -N-Acetylhexosaminidase (Hex)) erhaltenen N-Glykane des Fetuins angegeben. Verschiedene sialo N-Glykane wurden mittels Ionenaustauscher-HPLC (b) aufgetrennt und die Anzahl der N-Acetylneuraminsäuren den jeweiligen Peaks zugeordnet.

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das nicht-collagenartige extrazelluläre Matrixprotein Bone Sialoprotein (BSP) rekombinant in verschiedenen humanen Zell-Linien hergestellt, unter nativen Bedingungen aus humanen Knochen aufgereinigt und strukturell und funktionell charakterisiert. Die Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie ergab einen hohen Anteil an Zufallsknäuelstruktur. Calcium hatte einen geringen Einfluss auf die Konformation des Proteins, das im Elektronenmikroskop als globuläre Struktur, verbunden mit einer elongierten Struktur sichtbar war. Die Analyse der N- und O-Glykan-Strukturen auf BSP mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie ergab Unterschiede zwischen rekombinantem BSP und Knochen-BSP, wobei letzteres für Tumorzellen typische O-Glykane trug. Eine Bindung von rekombinantem BSP an Collagen I konnte nicht festgestellt werden. BSP wurde in einem Zellkulturmodell für die mineralisierte Knochenmatrix in Hydroxlyapatit-kristalle eingebaut und rekombinantes BSP zeigte eine gegenüber Knochen BSP verringerte Affinität für Hydroxlyapatit. Mittels Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen von vier verschiedenen Mammakarzinomzell-Linien wurde die intrazelluläre BSP-Expression für alle Zellen nachgewiesen, während nur zwei davon BSP auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die unterschiedliche Adhäsion der Mammakarzinomzell-Linien an rekombinantes BSP erfolgte unabhängig von der Zelloberflächenexpression des Proteins, war aber von einer intakten Sekundär- bzw. Tertiärstruktur abhängig.

Abstract

The noncollagenous extracellular matrix protein bone sialoprotein (BSP) was expressed recombinantly in different human cell lines, purified from human bone under native conditions, and its structure and function was characterized. Analyses of the secondary structure elements by CD spectroscopy revealed a high content of random coil structure. Calcium had a minor effect on the protein conformation and BSP was visualized by electron microscopy as a globular structure linked to a thread-like structure. The N-glycan and O-glycan structures on BSP, analyzed by HPLC and MALDI-TOF-mass spectrometry, were different for recombinant BSP and bone BSP, the latter having O-glycans that are typically found in tumor cells. Binding between collagen I and recombinant BSP could not be detected. The protein was incorporated into hydroxyapatite crystals in an in vitro cell culture model for formation of the mineralized bone matrix and recombinant BSP showed a lower affinity for hydroxyapatite than BSP isolated from bone. Using immunofluorescence and FACS-analyses, BSP expression was shown in four different breast cancer cell lines, whereas only two out of four expressed the protein on their surface. The different attachment of the four breast cancer cell lines to recombinant BSP was independent of their extracellular BSP expression, but depended on the intact secondary and tertiary structure of the protein.

Lebenslauf

Name: Martina Wuttke
Geburtsdatum: 21.04.1971
Geburtsort: Gummersbach
Adresse: Tempelstraße 30-32
50679 Köln
Tel. 0221/8008318

Schulischer Werdegang:

- 1977 - 1981 Städtische Gemeinschaftsgrundschule "Auf der Wahr" in 58540 Meinerzhagen.
- 1981 - 1990 Evangelisches Gymnasium Meinerzhagen; Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife; Notendurchschnitt des Abiturzeugnisses: 1,5.

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 1990 - 1995 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld; Abschluss des Vordiploms 1992 in den Fächern Biologie, Chemie und Physik mit der Note 1,0. Abschluss des Studiums nach zehn Semestern mit dem Diplom; Notendurchschnitt: 1,0.
- Die Diplomarbeit mit dem Titel "Molekulargenetische Charakterisierung der Region um das *wobbler*-Gen der Maus und mRNA-Studien an frühdiagnostizierten Wobbler-Mäusen" wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie der Universität Bielefeld erstellt.
- Von Juli bis September 1994 Absolvierung eines Praktikums am Picower Institute for Medical Research in New York in der Abteilung für Medizinische Biochemie.
- Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes.
- 1996 - 1997 Forschungstätigkeit am Picower Institute for Medical Research in New York in der Abteilung für Medizinische Biochemie; Promotorstudien von Cytokinen.
- Seit Nov. 1997 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Ziel der Promotion.

Erklärung zur Dissertation

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch in keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Keine Teilpublikationen.

Köln, November 2000

Martina Wuttke